

2014-2015

Thèse

pour le

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

**Etat des lieux des traitements
anthelminthiques sur *Haemonchus contortus*,
strongle gastro-intestinal des ovins.
Evaluation chimique et biologique sur ce
parasite de deux macromycètes : *Phellodon
niger* et *Hydnellum ferrugineum***

Marion Peters

Née le 12/06/1991

Sous la direction de Mme
Séverine Derbré

Membres du jury

Monsieur Nicolas Papon | Président
Madame Séverine Derbré | Directrice
Marieke Vansteelandt | Encadrante

Soutenue publiquement le :
Mercredi 16 Décembre 2015



Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie Monsieur Nicolas Papon, enseignant-chercheur en parasitologie à l'UFR Sciences Pharmaceutiques et ingénierie de la santé de l'Université d'Angers, pour avoir accepté d'être le président de ce jury de thèse.

Je remercie bien évidemment Madame Séverine Debré, Maître de conférences en pharmacognosie, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse et pour votre disponibilité afin de me faire part de vos conseils et des corrections à apporter.

Je remercie également Marieke Vansteelandt, maître de conférences en pharmacognosie, botanique et mycologie à la faculté de pharmacie de Toulouse, et membre de ce jury, pour sa disponibilité, ses conseils et pour m'avoir transmis ses connaissances avec gentillesse au tout au long du stage jusqu'à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Nicolas Fabre, directeur de l'UMR 152, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir guidée et pour m'avoir encouragée tout au long de ce stage.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mohamed Haddad, responsable de l'équipe PEPS et chargé de recherche à l'IRD, pour ses explications, sa rigueur et sa gentillesse.

Je remercie très sincèrement Cynthia Girardi, doctorante, d'un point de vue professionnel pour ses nombreuses compétences et explications, et d'un point de vue humain pour m'avoir conseillée, encouragée et fait passer de très bons moments dans cette équipe.

REMERCIEMENTS

Merci également à Pierre Perio, assistant ingénieur en physico-chimie, pour sa disponibilité et ses compétences en analytique.

Je remercie également Rachid Chawech, doctorant, voisin de paillasse, pour ses nombreux conseils et explications. Je tiens aussi à évoquer le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de ce laboratoire et je remercie particulièrement Franck Marie-Sainte et les non permanents, Alix Poinso-Ollivier, Solomiia Kozachok et Laura Rieusset.

D'autre part, je souhaite aussi remercier les membres de l'école vétérinaire, M. Hervé Hoste et Liza Fonzou, pour la réalisation des tests biologiques.

Je remercie également ma famille, papa, maman, Charlotte et Mathieu, qui m'a soutenue pendant ces longues années d'étude, qui n'a pas cessé de croire en moi et de m'encourager à chaque étape.

Mes remerciements s'adressent également à mes amies de la faculté de pharmacie d'Angers, Floriane, Anne-Laure, Amandine, Chloé et Florence avec qui j'ai passé de très bons moments pendant ces 6 années.

Pour finir, je tiens à remercier particulièrement Alexandre, qui me soutient tous les jours, notamment dans l'écriture de cette thèse, et qui m'apporte force et courage.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Marion PETERS** déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **18 Novembre 2015**

Marion Peters



« *Le savoir que l'on ne complète pas chaque jour diminue tous les
jours* »
(Inconnu)

Table des figures.....	10
Table des tableaux	12
Abréviations.....	13
Lexique.....	15
Introduction	16
PARTIE I : Généralités sur la strongylose à <i>Haemonchus contortus</i>	19
1. Classification	19
2. Anatomie.....	19
3. Cycle de vie.....	19
4. Symptômes.....	21
5. Diagnostic clinique.....	21
5.1. Diagnostic sur l'animal vivant.....	21
5.1.1. Coproscopie.....	21
a) Prélèvement.....	21
b) Méthodes qualitatives.....	22
c) Méthodes quantitatives.....	23
5.1.2. Coproculture.....	24
5.2. Diagnostic sur l'animal mort.....	26
5.3. Dans l'herbe	26
6. Moyens de lutte contre les strongles gastro-intestinaux chez les ovins	26
6.1. Phénothiazine	27
6.2. Les anté-endectocides	27
6.2.1. Les benzimidazoles et les pro-benzimidazoles.....	27
a) Les molécules	28
b) Mode d'action [20].....	29
c) Propriétés physico-chimiques	30
d) Formes pharmaceutiques	30
e) Métabolisme [23]	30
f) Spectre d'action.....	31
g) Toxicité	31
6.2.2. Les imidazothiazoles et tétrahydropyrimidines	31
a) Les molécules	31
b) Mode d'action.....	32
c) Propriétés physico-chimiques	33
d) Formes pharmaceutiques	33
e) Métabolisme.....	33
f) Spectre d'action.....	34

g)	Toxicité	34
6.2.3.	Phénols halogénés	34
a)	Les molécules	34
b)	Mode d'action	35
c)	Propriétés physico-chimiques	36
d)	Formes pharmaceutiques	36
e)	Métabolisme	36
f)	Spectre d'action	36
g)	Toxicité	36
6.2.4.	Bilan sur les anté-endectocides	36
6.3.	Les endectocides	37
6.3.1.	Les lactones macrocycliques	37
a)	Les molécules	37
b)	Mode d'action	38
c)	Propriétés physico-chimiques	38
d)	Formes pharmaceutiques	38
e)	Métabolisme	39
f)	Spectre d'action	39
g)	Toxicité	39
6.3.2.	Bilan sur les endectocides	39
6.4.	Bilan sur les anthelminthiques de synthèse	40
7.	Prévention	41
7.1.	Les strongylicides à action immédiate	41
7.2.	Les strongylicides à action rémanente	42
8.	Apparition de résistances	43
8.1.	Définition de la résistance	43
8.2.	Parasites touchés par la résistance	44
8.3.	Historique de l'apparition des résistances	45
8.4.	Mécanismes d'apparition des résistances	46
8.4.1.	Facteurs de développement de résistance	46
a)	Subthérapeutiques doses	46
b)	Utilisation d'un groupe d'anthelminthiques	46
8.4.2.	Mécanisme pharmacologique	47
PARTIE II : Alternatives face aux phénomènes de résistance des anthelminthiques		48
1.	Alternatives aux traitements médicamenteux dans la lutte contre les strongyloses	48
2.	Alternatives développées au laboratoire PHARMA-DEV	49
3.	Présentation du laboratoire PHARMA-DEV	49
4.	Matériels biologiques étudiés	50
4.1.	Classification	50

4.2.	Molécules isolées dans la littérature	51
4.2.1.	<i>Phellodon niger</i>	52
4.2.2.	<i>Hydnellum ferrugineum</i>	54
PARTIE III : Travaux expérimentaux : Etude chimiques et biologiques d'<i>Hydnellum ferrugineum</i> et <i>Phellodon niger</i>		55
1.	Matériels et méthodes utilisés	55
1.1.	Macromycètes	55
1.2.	Extraction	55
1.3.	Evaluation de l'activité biologique des extraits sur <i>Haemonchus contortus</i>	56
1.3.1.	Test d'éclosion des œufs (EHA) [64][65][66]	56
a)	Récupération des œufs	56
b)	Préparation des extraits	57
1.3.2.	Test de dégainement des larves (LEIA) [66][67]	58
a)	Choix de l'étalon	58
b)	Protocole du test de dégainement (mise en contact des extraits avec les larves)	59
c)	Suivi de la cinétique de dégainement	59
1.4.	Analyses chimiques	60
1.4.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM)	60
1.4.2.	Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (CLUHP-BD)	60
1.4.3.	Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem et à un détecteur de type Corona (CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona)	62
1.4.4.	Chromatographie liquide ultra performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution (CLUP®-ESI-QToF-SM ^E)	63
1.4.5.	Chromatographie sur couche mince couplée à un spectromètre de masse (CCM-SM)	64
1.5.	Fractionnement	65
2.	Résultats et discussion	66
2.1.	Extraction	66
2.2.	Evaluation de l'activité biologique des extraits sur <i>Haemonchus contortus</i>	66
2.2.1.	Test d'éclosion des œufs (EHA)	67
2.2.2.	Test de dégainement des larves (LEIA)	69
2.2.3.	Bilan sur l'activité des extraits	71
2.3.	Analyses chimiques des extraits bruts des deux macromycètes	71
a)	Chromatographie sur couche mince (CCM)	71
b)	Extraits aqueux des deux macromycètes	73
c)	Extrait méthanolique d' <i>Hydnellum ferrugineum</i>	73
d)	Extrait méthanolique de <i>Phellodon niger</i>	80
Conclusion		98
Bibliographie		101

Table des figures

Figure 1 : Larve (gauche) et œuf (droite) d' <i>Haemonchus contortus</i> observé au microscope [9]	19
Figure 2 : Cycle de vie d' <i>Haemonchus contortus</i> [10]	20
Figure 3 : Schéma et photographie d'une lame de Mac Master [14]	23
Figure 4 : Aide au diagnostic chez les ovins [14]	25
Figure 5 : Structure de la Phénothiazine (1)	27
Figure 6 : Structures chimiques des pro-benzimidazoles (2 à 4)	28
Figure 7 : Structures chimiques des benzimidazoles (5 à 10)	29
Figure 8 : Mode d'action des benzimidazoles [20]	30
Figure 9 : Structure chimique des imidazothiazoles : levamisole (11) et tétramisole (12) [25]	32
Figure 10 : Structures chimiques des tétrahydropyrimidines (13) et (14)	32
Figure 11 : Action d'un cholinomimétique direct (imidazothiazoles ou tétrahydropyrimidines) dans une synapse nicotinique [27]	33
Figure 12 : Structure chimique d'un salicylanilide, le closantel (15) et d'un phénol halogéné, le nitroxinil (16)	35
Figure 13 : Mode d'action des phénols halogénés : phosphorylation oxydative mitochondriale [28]	35
Figure 14 : Structures chimiques des avermectines et milbémycine (17 à 21)	37
Figure 15 : Mode d'action des avermectines dans la synapse nicotinique du nématode [32]	38
Figure 16 : Principes d'action des médicaments contre les strongles gastro-intestinaux [36]	43
Figure 17 : Photographie des champignons <i>Hydnellum ferrugineum</i> (gauche) et <i>Phellodon niger</i> (droite)	50
Figure 18 : Structures des composés identifiés chez <i>Phellodon niger</i>	53
Figure 19 : Structures des composés identifiés chez <i>Hydnellum ferrugineum</i>	54
Figure 20 : Formation de l'acide théléphorique (38) et de l'hydnuferrogine (36) à partir d'un précurseur commun [61]	54
Figure 21 : Méthode d'extraction : montage au reflux	56
Figure 22 : Réalisation de la plaque pour le test EHA	58
Figure 23 : <i>Haemonchus contortus</i> engainé (gauche) et dégainé (droite) [68]	58
Figure 24 : Gradient ACN/eau HCOOH utilisé pour la séparation en CLUHP-BD avec la colonne C18 Kinetex	61
Figure 25 : Gradient ACN/eau utilisé pour la détection en CLUHP-BD avec la colonne HILIC Luna	62
Figure 26 : Gradient ACN/eau HCOOH utilisé pour la détection en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona avec la colonne C18 Kinetex	63
Figure 27 : Alternance de collecte de données de basse (MS ^E) et de haute énergie de collision (MS) [70]	64
Figure 28 : Montage du fractionnement de l'extrait méthanolique de <i>Phellodon niger</i>	65
Figure 29 : CCM des extraits polaires HFE, PNE et HFM, PNM (gauche) et CCM des extraits apolaires HFC, PNC et HFD, PND (droite)	72
Figure 30 : Zoom de la comparaison de la préparation et du volume d'injection sur HFM en CLUHP-BD	74
Figure 31 : Extrait de <i>H.ferrugineum</i> méthanolique en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d)	76
Figure 32 : Spectre de masse du pic 1 (TR : 6,3 min), en mode positif d'ionisation full scan (a) et spectre de fragmentation MS ² obtenu en data dependent scan (b)	76
Figure 33 : Réarrangement à partir d'une terphénylquinone (39) en hydnuferrogine (36) ou en hydnuferrogine (37) ou en acide théléphorique (38) d'après Gripenberg en 1981 [62]	77
Figure 34 : Spectre de masse du pic 2 (TR : 7.40 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS ² obtenu en « data dependent scan » (b)	78

Figure 35 : Spectre de masse du pic 2 de HFM (TR : 7,40 min), en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS ² obtenu en mode data dependent scan (b)	79
Figure 36 : Comparaison de la préparation et du volume d'injection de l'extrait PNM en CLUHP-BD	81
Figure 37 : Chromatogrammes de l'extrait méthanolique de <i>P.niger</i> obtenus par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d) et spectre UV du pic à 7,51 min (e)	82
Figure 38 : Spectre de masse du pic 1 (TR : 7,2 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS ² obtenu en mode « data dependent scan » (b)	82
Figure 39 : Spectre de masse du pic 1 de PNM (TR : 7,1 min), en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS ² obtenu en mode data dependent scan (b)	83
Figure 40 : Structure de l'acide théléphorique (38)	84
Figure 41 : Spectre de masse du pic 2 (TR : 7,72 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS ² obtenu en « data dependent scan » (b)	84
Figure 42 : Spectre de masse du pic 2 de PNM (TR : 7,80 min), en full scan en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS ² obtenu en mode data dependent scan (b)	85
Figure 43 : Chromatogramme LCMS de l'extrait PNM analysé en CLUP®-ESI-QTOF-SM ^E (mode positif d'ionisation)	86
Figure 44 : Spectres de masses du pic 1 (TR : 5,32 min) de PNM en CLUP-QTOF en POS (a) et en NEG (b) et spectres de fragmentation SM ^E (c et d)	87
Figure 45 : Spectre de masse du pic 2 (TR : 6,53 min) de PNM en CLUP-QTOF (a) en POS et spectre de fragmentation SM ^E (b)	88
Figure 46 : CCM récapitulative des fractions réunies de l'extrait PNM de 1 à 38 (à gauche) et	90
Figure 47 : Chromatogrammes de la fraction 28-29 de l'extrait méthanolique de <i>P.niger</i> obtenus par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d) et le spectre UV du pic à 7,50 min (e)	91
Figure 48 : Spectre de masse en full scan du pic (TR : 7,76 min) de la fraction 28-29 de PNM, en mode positif d'ionisation	92
Figure 49 : Chromatogramme de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM ^E	92
Figure 50 : Spectre de masse du pic 1 (TR : 5,88 min) de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM ^E en positif (a) et spectre de fragmentation SM ^E (b)	93
Figure 51 : Structure chimique de l'acide pulvinique (40)	93
Figure 52 : Spectre de masse du pic 2 (TR : 6,51 min) de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM ^E en positif et spectre de fragmentation SM ^E (b)	94

Table des tableaux

Tableau 1 : Analyses coproscopiques chez les ovins : numération après enrichissement [12]	24
Tableau 2 : Identification des larves L3 des strongles des ruminants [12]	26
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des traitements utilisés pour les strongyloses digestives sur les ovins [12] [18] [22] [23][34]	40
Tableau 4 : Temps d'attente des principaux anthelminthiques strongyloides chez les petits ruminants [19]	41
Tableau 5 : Anthelminthiques à action immédiate	42
Tableau 6 : Anthelminthiques à action rémanente	42
Tableau 7 : Intensité de la résistance selon le facteur de résistance	44
Tableau 8 : Espèces de parasites résistants aux principales classes d'anthelminthiques	45
Tableau 9 : Tableau indiquant l'apparition de résistance aux différentes classes d'anthelminthiques suite à leur mise sur le marché	45
Tableau 10 : Comparaison des deux champignons étudiés	51
Tableau 11 : Tableau des paramètres de masse de la source ESI sur le LCQ	63
Tableau 12 : Tableau des paramètres de masse de la source ESI sur QTOF	64
Tableau 13 : Abréviations données aux extraits des deux champignons	66
Tableau 14 : Rendements massiques obtenus pour chaque extrait	66
Tableau 15 : Résultats du test EHA du témoin positif, le thiabendazole, sur la souche sensible (JUAN) et sur la souche résistante (WR)	67
Tableau 16 : Résultats du test EHA sur la souche sensible (JUAN) des différents extraits	68
Tableau 17 : Résultats du test EHA sur la souche résistante (WR) des différents extraits	69
Tableau 18 : Résultats du test LEIA sur souche sensible (JUAN) des différents extraits	70
Tableau 19 : Résultats du test LEIA sur souche résistante (WR) des différents extraits	70
Tableau 20 : Tableau récapitulatif des fractions obtenues à partir de PNM	89
Tableau 21 : Récapitulatif des analyses de spectrométrie de masse sur les extraits méthanoliques des deux espèces étudiées	97
Tableau 22 : Récapitulatif des analyses chimiques sur la fraction 28-29 de l'extrait <i>Phellodon niger</i> méthanolique (PNM)	97

Abréviations

(1) : désigne une molécule

1 : désigne un pic présent sur un chromatogramme

[1] : désigne une référence bibliographique

ACN : Acétonitrile

AHs : Anthelminthiques de synthèse

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BAW : Butanol/Acide acétique/Eau : 4/1/5 (v/v/v)

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CHCl₃ : Chloroforme

CLHP-BD : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur à barrette de diode

UPLC®-ESI-QTOF-SM^E : Chromatographie Liquide Ultra Performance couplée à un spectromètre de masse avec une source électrospray et un analyseur de type quadripôle à temps de vol

CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance couplée à un spectromètre de masse en tandem avec une source électrospray et un analyseur à trappe d'ions et un détecteur Corona

d : densité

DCI : dénomination Commune Internationale

DL₅₀ : Dose létale provoquant la mort de 50% d'une population animale donnée

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EC₅₀ : Concentration efficace à laquelle 50% de l'activité ciblée est inhibée

EGCG : Epigallocatechine gallate

EHA : *Egg Hatch Assay* : Test d'éclosion des œufs

HFC : Extrait cyclohexane d'*Hydnellum ferrugineum*

HFD : Extrait dichlorométhane d'*Hydnellum ferrugineum*

HFE : Extrait aqueux d'*Hydnellum ferrugineum*

HFM : Extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*

H₂O : Eau

HCOOH : Acide formique

IC₉₅ : Intervalle de confiance pour lequel 95 % des valeurs se trouvent dedans

IM : Intra-Musculaire

LEIA : *Larval Exhealthment Inhibition Assay* : Test de dégainement des larves

MeOH : Méthanol

mm : millimètre

MM : Masse Moléculaire

m : moyenne

m/z : rapport masse / charge

N : nombre d'œufs

OPG : Œufs par Grammes de Fèces

PBS : tampon phosphate salin

PCR : Réaction en chaine par polymérase

PEP : Prolyl Endopetidase

PNC : Extrait cyclohexane de *Phellodon niger*

PND : Extrait dichlorométhane de *Phellodon niger*

PNE : Extrait aqueux de *Phellodon niger*

PNM : Extrait méthanolique de *Phellodon niger*

R_f : Rapport frontal

SC : Sous cutanée

sh : épaulement

t/min : Tours par minute

TC : Trans-cutanée

TI : Trappe d'ions

VO : Voie Orale

Lexique

Ataxie = Pathologie neuromusculaire consistant en un manque de coordination fine des mouvements volontaires, liée à une atteinte du système nerveux.

Hyperesthésie = Exagération physiologique ou pathologique de l'acuité visuelle et de la sensibilité des divers sens.

Intrants = Ce sont les différents produits nécessaires au fonctionnement de l'exploitation agricole provenant du marché extérieur. Cela inclut les engrais, les produits phytosanitaires, les activateurs / retardateurs de croissance, les aliments pour animaux non produits à la ferme et les médicaments.

Monoxène : Parasites qui n'ont besoin que d'un seul hôte durant toute leur vie. On parle d'hôte définitif.

Pour-on = Application en épicutané pour contrôler la présence d'ectoparasites. C'est une des techniques d'appât vivant facile à administrer puisqu'il s'achète en formules prêtes à l'emploi et qu'il ne requiert aucun bain, couloir d'aspersion ni matériel d'aspersion à main ou à pression. En revanche, les formulations, sous forme d'huile, sont fournies en sachets ou dans des bouteilles qu'il faut verser sur le dos de l'animal en partant normalement de la base du cou vers la queue.

Rémanence = Durée pendant laquelle un traitement continue à exercer son action.

Sporée = Ensemble des spores recueillies sous le chapeau d'un champignon pour connaître la couleur et l'aspect des spores .

Tératogénicité = Effet indésirable potentiel provoqué par certains médicaments provoquant des anomalies ou des déformations fœtales. L'utilisation de ces médicaments est contre-indiquée chez la femme enceinte.

Tubuline = Protéine structurale qui, polymérisée, constitue les microtubules.

Introduction

Les traitements antiparasitaires représentent un enjeu économique capital en pharmacie vétérinaire. Or, l'efficacité des molécules utilisées dans les schémas thérapeutiques classiques est considérablement menacée par l'émergence de résistances des parasites vis à vis des traitements [1]. L'industrie pharmaceutique est de plus en plus démunie face à cette problématique. Il est donc urgent de proposer des alternatives. De plus, un des souhaits profonds en Europe est de voir diminuer la part des intrants* chimiques (comme le sont les médicaments antiparasitaires de synthèse) dans les produits alimentaires. C'est dans ce cadre que le projet CARES a pris naissance en partenariat avec 5 pays européens dont la France via l'école vétérinaire de Toulouse [2]. Ses objectifs sont d'améliorer le délai de diagnostic de résistance et d'améliorer l'efficacité d'anthelminthiques disponibles. Plus particulièrement, ce projet souhaite proposer des solutions alternatives pour contrôler les nématodes gastro-intestinaux, résistants aussi aux anthelminthiques de synthèse, et d'appliquer ces méthodes aux conditions d'élevage. En effet, le parasite étudié *Haemonchus contortus*, hémaphysogone, est responsable de pertes importantes de production dans les élevages d'ovins et caprins. Il provoque une altération de l'état général des animaux : troubles digestifs, perte de poids, anémie, altération de la qualité de la laine et de la capacité de reproduction. La pathologie provoquée par ce parasite est appelée haemonchiose. Les pays tropicaux sont principalement touchés en raison d'une grande capacité d'adaptation aux variations climatiques de ce parasite. L'étude de Qamar et al, en 2009 [3], démontre que les ovins sont principalement touchés lors des saisons chaudes, soit de juin à août. Les solutions alternatives seraient d'utiliser des produits naturels. Des études précédentes sur le sainfoin (*Onobrychis* sp.), une plante fourragère, ont été réalisées au sein du laboratoire PEPS [4] et ont montré le rôle des tanins et des flavonols glycosylés dans l'éradication d'*Haemonchus contortus*. A la suite de cette étude, des granulés de sainfoin sont donnés aux moutons à l'école vétérinaire.

De la même façon, l'exploitation des ressources mycologiques perçues comme naturelles, pourraient conduire au même résultat. Il existe en Europe plus de 6000 espèces de champignons sauvages, participant activement à la richesse de la biodiversité végétale européenne. Dans les forêts françaises, ce sont plus de 3000 espèces différentes qui peuvent être cueillies dont environ 500 sont comestibles. Les champignons font partie

des produits naturels les plus anciennement consommés par l'homme. Toutefois, seules quelques dizaines d'espèces ont un réel intérêt économique. Les autres, apparaissant de faible valeur, sont actuellement non consommées malgré un intérêt notable par le passé ; ce sont les champignons dits « oubliés ». Leurs propriétés nutritives en Europe et médicinales en Chine, ont été étudiées depuis des temps très anciens. Un certain nombre d'espèces de champignons ont été reportées lors de ces dernières années comme possédant des propriétés antioxydantes dont *Lactarius deliciosus* [5]. De plus, des activités antimicrobiennes ont été découvertes sur *Russula delica* [6]. De ce fait, les multiples applications et usages possibles font de ces champignons de véritables sources de produits à haute valeur ajoutée tels que des aromatisants, des colorants, des additifs et des compléments alimentaires, voire des médicaments. Malheureusement, ces voies de la mycothérapie sont encore peu exploitées en Europe en comparaison à l'Asie. Ces « champignons oubliés » constituent donc une bioressource notable et non concurrentielle du secteur alimentaire, pour le développement de nouveaux bioproduits pour des applications en industries agro-alimentaire et pharmaceutique.

En parallèle du projet européen CARES portant sur la recherche de nouveaux composés antiparasitaires, le travail présenté ici fait partie intégrante d'un projet régional visant à la valorisation des champignons oubliés. En 2011, le laboratoire de chimie agro-industrielle (LCA), PHARMA-DEV et la société PEBEYRE SAS ont mis en place le projet MYCORAFF, suivi en 2013 par le projet MYCOVAL, tous deux co-financés par le Conseil Régional Midi-Pyrénées visant à valoriser les molécules d'intérêt de ces extraits fongiques dans le domaine alimentaire, aromatique, médicinal : anti-oxydant et anti-bactérien.

Dans ce cadre, de récents travaux portant sur l'activité anthelminthique d'extraits de champignons, ont montré qu'ils pouvaient être à l'origine de découvertes prometteuses dans le domaine de la pharmacologie antiparasitaire [7]. Ces résultats préliminaires ont été approfondis pour consolider leur potentiel thérapeutique antiparasitaire afin d'envisager à terme la mise en place en Midi-Pyrénées d'une filière de mycothérapie : c'est l'objectif du présent projet MYCOVAL. Mon stage de master 2 s'est déroulé dans ce contexte au sein du laboratoire PHARMA-DEV. Il visait à étudier la composition chimique d'extraits de *Phellodon niger* et d'*Hydnellum ferrugineum* et de corrélérer l'activité antiparasitaire éventuelle à la présence de métabolites secondaires particuliers ainsi que d'isoler la (ou les) molécule(s) responsable(s) de cette activité biologique par fractionnement bioguidé.

L'objectif de cette thèse est d'illustrer l'intérêt des métabolites secondaires fongiques antiparasitaires comme alternative aux traitements classiques. Aussi, après une première partie présentant des généralités sur les strongyloses gastro-intestinales et leurs traitements allopathiques, une seconde partie traitera les alternatives en place et celles à développer notamment à l'école vétérinaire de Toulouse. Dans une troisième partie, j'exposerai mes travaux personnels réalisés au laboratoire PHARMA-DEV consistant en une étude chimique et biologique de deux espèces, *Phellodon niger* et *Hydnellum ferrugineum*.

PARTIE I : Généralités sur la strongylose à *Haemonchus contortus*

1. Classification

Haemonchus contortus est un parasite hématophage de la caillette (4^{ème} estomac) des ovins et caprins. La classification, élaborée par Durette-Desset et Chabaud en 1993 [8], montre que ce vers appartient à l'embranchement des Nématelminthes, à la classe des Nématodes et à la famille des *Trichostrongylidae* (strongles).

2. Anatomie

Le ver adulte mesure de 10 à 30 mm (Figure 1). C'est un ver rond et rouge (à cause de son mode d'alimentation). Il possède une épaisse cuticule, transparente et montrant des stries longitudinales, lui permettant de résister aux sucs digestifs de l'animal infesté. Les œufs sont ovoïdes, de taille 45 x 80 µm, et disposent d'une fine coquille. Ils contiennent 16 à 32 cellules blastomères.



Figure 1 : Larve (gauche) et œuf (droite) d'*Haemonchus contortus* observé au microscope [9]

3. Cycle de vie

Haemonchus contortus a un cycle monoxène*. Ce cycle se déroule en deux temps : une phase libre dans le milieu extérieur et une phase interne dans le système digestif de l'animal (Figure 2).

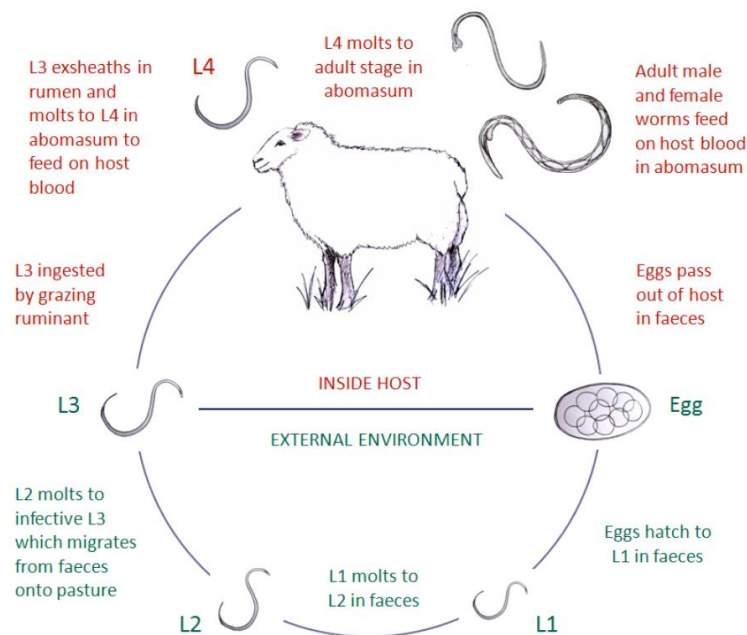


Figure 2 : Cycle de vie d'*Haemonchus contortus* [10]

Une fois les œufs pondus par le ver femelle dans la caillette de l'animal, ils sont éliminés dans les matières fécales de l'hôte. Ceci constitue la phase libre. Ces œufs s'embryonnent et donnent naissance à des larves de stade 1 (L1) qui muent ensuite en 1 ou 2 jours en larves de stade 2 (L2). Ces dernières évoluent en larves infestantes L3 au cours d'une deuxième mue, qualifiée d'incomplète car la larve infestante reste engainée. L'évolution de l'œuf en larve L3 s'effectue généralement en 5 à 6 jours. La durée de cette phase dépend des conditions extérieures puisque les larves L3, protégées par leur gaine, sont très résistantes dans l'environnement. Les conditions favorables se présentent lorsque la température est comprise entre 18 et 26°C et que l'humidité est supérieure à 70%.

La phase interne commence par l'ingestion des larves L3 par l'hôte lors du pâturage. Ces larves vont perdre complètement leur gaine lors du passage dans la caillette. Elles migrent ensuite dans la muqueuse digestive pour y subir une nouvelle mue en larves L4. Elles évoluent alors en stade 5, dits juvéniles avant de donner des adultes mâles et femelles. La durée comprise entre l'ingestion des larves infestantes et la ponte par des femelles est d'environ 3 semaines. Les femelles, après fécondation, pondent des œufs qui sont excrétés dans les matières fécales de l'hôte et le cycle peut alors recommencer [11].

4. Symptômes

Les vers adultes sont responsables de la pathologie, appelée haemonchose ou strongylose de la caillette. Le symptôme principal est l'anémie. L'haemonchose peut se trouver sous trois formes :

- Haemonchose suraigüe : due à une infestation massive chez des animaux sains qui meurent subitement d'une gastrite hémorragique sévère. Cette forme est peu fréquente ;
- Haemonchose aiguë : donnant lieu à une anémie progressive et profonde. La moelle osseuse ne parvient pas à compenser les pertes en érythrocytes et l'animal finit par mourir. Cette forme est typique et est caractérisée par les symptômes suivants : arrêt de la prise alimentaire, œdème sous-glossien (signe de la bouteille), accélération des mouvements respiratoire et cardiaque [12] ;
- Haemonchose chronique : progressant à bas bruit et aboutissant à une dégradation de l'état général et à une malnutrition sévère. C'est la forme la plus fréquente de la maladie entraînant de lourdes pertes chez les éleveurs.

5. Diagnostic clinique

5.1. Diagnostic sur l'animal vivant

L'analyse coprologique permet à l'éleveur de connaître l'état parasitaire de son troupeau en évaluant le degré d'infestation des animaux et en identifiant les parasites présents [12]. Un traitement pourra alors être réalisé si nécessaire ainsi qu'un ajustement de celui-ci pourra être évalué, en fonction du parasitisme.

5.1.1. Coproscopie

a) Prélèvement

Plusieurs dizaines de grammes de matières fécales doivent être soit recueillies immédiatement après leur rejet par les animaux soit prélevées directement dans le rectum. Elles sont récupérées dans des pots individuels portant le numéro d'identification de l'animal [13]. Les prélèvements sont ensuite broyés et homogénéisés.

b) Méthodes qualitatives

Ces méthodes permettent l'identification des espèces parasites présentes dans les matières fécales après enrichissement [13].

Enrichissement par sédimentation simple [13]

Cinq à dix grammes de fèces sont diluées dans 5 à 10 fois leur poids en eau. Après broyage, elles sont ensuite mélangées puis tamisées afin de récupérer le filtrat qui est laissé au repos pendant 10 à 12 heures dans un verre conique. Le surnageant est retiré et le reliquat est homogénéisé. Deux gouttes sont examinées entre lame et lamelle au microscope. Afin d'améliorer les résultats de cette méthode lente, une centrifugation à 1500 t/min pendant 3 minutes peut être envisagée. Les parasites sont alors recherchés dans le culot de centrifugation après avoir éliminé le surnageant. Cependant, la lecture peut être rendue difficile par la présence de nombreux débris.

Enrichissement par flottation [13]

Dans cette méthode, le prélèvement est dilué dans un liquide dense afin de permettre, par l'action de la pesanteur ou par une centrifugation, aux éléments parasites de remonter à la surface du liquide où ils peuvent alors être recueillis. Plusieurs liquides sont utilisables tels qu' :

- une solution de sulfate de zinc à 33% (d : 1,18) ;
- une solution saturée de chlorure de sodium (d : 1,19) ;
- une solution saturée de saccharose (d : 1,27) ;
- une solution saturée en sulfate de magnésium (d : 1,28) ;
- de l'iodomercurate de potassium (d : 1,44), appelé réactif de Nessler.

L'iodomercurate de potassium permet une ascension parfaite bien que ce soit un liquide polluant et dangereux. Les solutions saturées présentent aussi des inconvénients comme le fait de former des cristaux rapidement.

La méthode consiste alors à remplir complètement un tube à essai du mélange préalablement tamisé. Une lamelle est placée à la surface et la préparation est laissée vingt minutes au repos. De la même manière que lors de l'enrichissement par sédimentation simple, une centrifugation à 1500 t/min pendant 3 minutes peut aussi être réalisée. Lors de la récupération de la lamelle, une goutte de liquide est entraînée. La lamelle où se sont accumulés les parasites est alors déposée délicatement sur une lame et observée au microscope.

Recherche des larves par la méthode de Baermann [13]

Cette technique requiert l'utilisation d'un appareil de Baermann consistant en un entonnoir muni d'un tuyau à son extrémité afin de récolter le liquide. Dans une passoire enveloppée de tissu de gaze sont disposées les fèces. L'entonnoir est alors rempli d'eau qui doit affleurer la base des matières fécales sans les noyer. Après 24 à 48h, les larves sont recherchées dans le culot recueilli après centrifugation de 10 mL de cette préparation.

c) Méthodes quantitatives

Afin de déterminer un nombre moyen d'éléments parasites par gramme de fèces, il est nécessaire d'utiliser des méthodes quantitatives.

Méthode de McMaster [13]

Cette méthode reprend le principe de flottation mais nécessite l'utilisation d'une « cellule McMaster » (Figure 3). Cinq grammes de matières fécales sont broyées dans un mortier puis sont mises en suspension dans un liquide dense tel que du sulfate de magnésium ou du sulfate de zinc. Le mélange est filtré au travers d'un passe-thé afin de récupérer le filtrat et de le placer dans une éprouvette de 125 mL. Le même liquide dense est utilisé pour compléter à 75 mL. Après avoir mélangé le contenu, une petite quantité de suspension est prélevée et est introduite dans les deux chambres de la cellule en évitant la formation de bulles.

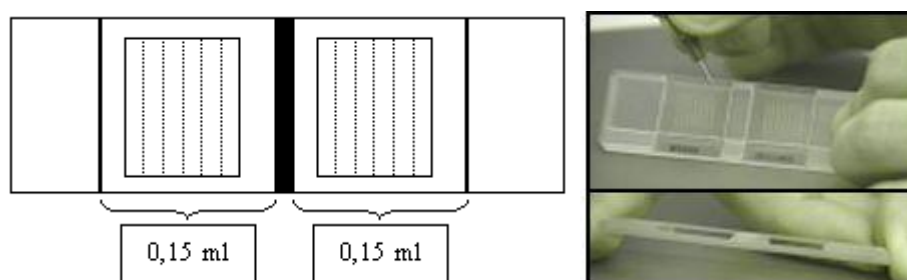


Figure 3 : Schéma et photographie d'une lame de Mac Master [14]

Après cinq minutes, la lame est examinée au microscope à un faible grossissement (objectif x 10) afin de compter les œufs de chaque type parasite présents sous chaque bande des deux carrés gravés sur le plafond des chambres. La moyenne (m) des deux nombres est calculée et multipliée par 100 pour obtenir le nombre d'œufs (N) par grammes de fèces (OPG). Pour augmenter la sensibilité de la méthode, les œufs présents dans la totalité des deux chambres peuvent être comptés, le nombre trouvé est alors multiplier par 50 Le seuil de sensibilité de la méthode est de 15 OPG.

Résultats – Interprétations

Le résultat d'une coproscopie consiste en l'identification des œufs. Concernant les strongles digestifs, une strongylose est suspectée à partir de 1000 OPG chez les ovins (Tableau 1).

Tableau 1 : Analyses coproscopiques chez les ovins : numération après enrichissement [12]

Infestation (OPG)	Légère	Moyenne	Importante	Très importante
Œufs d' <i>Haemonchus</i>	500	500 à 1000	1000 à 3000	> 3000

Cependant, il existe une très grande variation dans les résultats ainsi que de nombreuses causes d'erreurs notamment la prolificité des femelles variable en fonction de :

- la saison (augmentation printanière) ;
- l'état physiologique de l'hôte (augmentation pendant la lactation chez les brebis) ;
- l'état d'immunité de l'hôte ;
- l'espèce parasitaire (5000 œufs par jour pour *Haemonchus*).

5.1.2. Coproculture

Cette technique apporte des informations utiles concernant l'identification d'espèces et du genre des parasites, notamment dans le cas des œufs de strongles de ruminants (ovins), de porcins ou d'équidés. Des conditions favorables de température et d'hygrométrie permettent de favoriser l'évolution des œufs en larves jusqu'au stade L3 (larves infestantes) qui sont facilement identifiables.

La méthode consiste à broyer les fèces et à les placer en couche dans des boîtes de Petri. Les fèces sont humidifiées par addition d'une solution aqueuse à 0,1% de carbonate de sodium afin d'éviter la prolifération des moisissures. Ces boîtes sont déposées sans leur couvercle dans un cristalliseur dans lequel ont été préalablement placés des tampons de coton hydrophile imbibés d'eau. Le cristalliseur, recouvert d'une vitre est laissé à l'obscurité à température ambiante. La vitre est retirée pendant une heure chaque jour pendant laquelle les excréments sont ré-humidifiés si nécessaire avec la même solution carbonatée et sont oxygénés en remuant avec un agitateur. En dix à quinze jours, l'évolution des larves atteint le stade L3. L'appareil de Baermann permet de recueillir les larves en 24 à 48h. Les larves sont ensuite examinées entre lame et lamelle, après

immobilisation, soit par un passage rapide de la lame à la flamme soit par l'immersion des larves dans une solution iodée soit par immersion dans un liquide visqueux (solution de gomme arabique).

Afin d'identifier le parasite présent dans les fèces, il est important d'observer différents aspects morphologiques. Les paramètres suivants permettent d'identifier le parasite : larve engainée ou non, la taille de la larve, le nombre de cellules intestinales et la forme de la queue (Figure 4) et (Tableau 2).

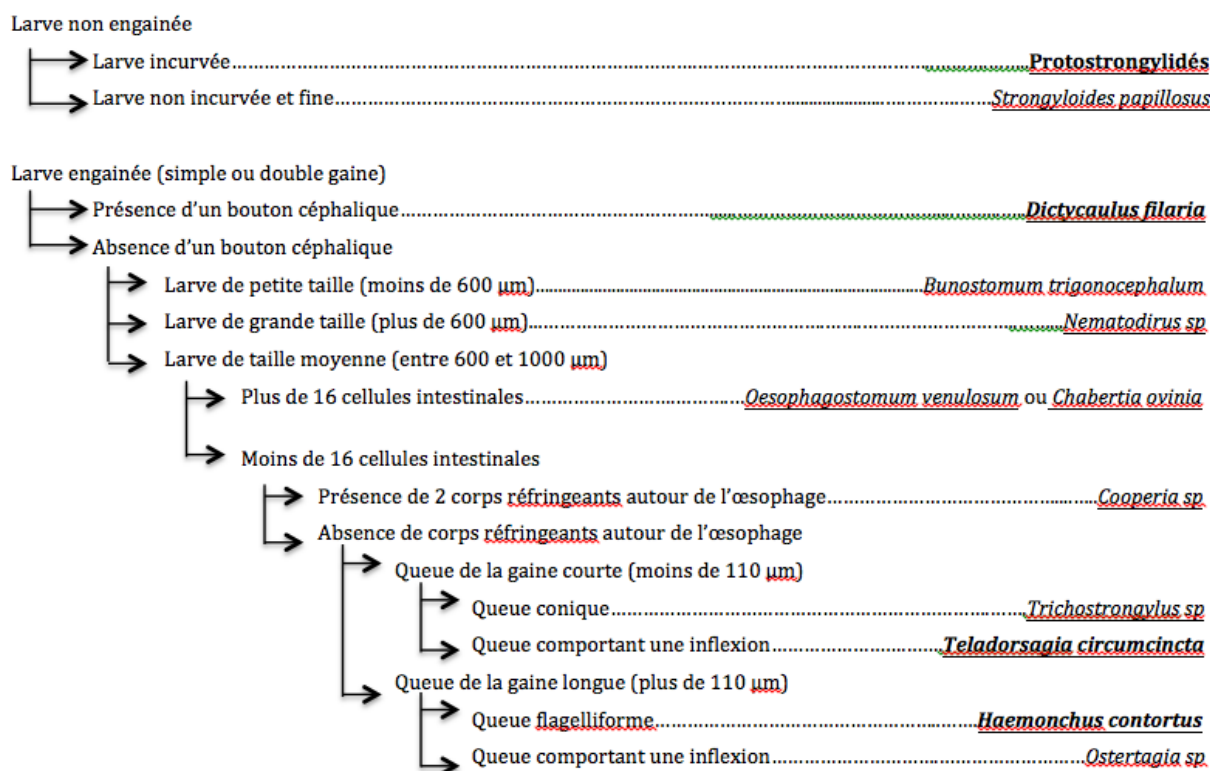


Figure 4 : Aide au diagnostic chez les ovins [14]

Les parasites figurant en caractères gras sont les plus fréquents. Ceux soulignés sont souvent rencontrés et ceux non soulignés sont rares.

Tableau 2 : Identification des larves L3 des strongles des ruminants [12]

Genre et/ou espèce	Dimensions et aspect		Cellules intestinales		Aspect de l'extrémité antérieure	Autres éléments morphologiques
	Longueur totale μm	Queue de la gaine	Nombre	Aspect		
<i>Trichostrongylus sp</i>	700	Courte, pointue	16	Assez nettes	Aplatie et rétrécie	Queue de la larve arrondie avec 1 ou 2 tubérosités
<i>Teladorsagia sp</i>	700 - 850	Courte, pointue	16	Assez nettes	Carrée	Queue de la larve arrondie
<i>Ostertagia sp</i>	700 - 850	Moyenne, pointue	16	Assez nettes	Carrée	Queue de la larve arrondie
<i>Cooperia</i>	750 - 850	Moyenne, pointue	16	Assez nettes	Carrée avec 2 éléments réfringents	NR
<i>Haemonchus sp</i>	750 - 850	Moyenne, pointue ; décalée	16	Assez nettes	Large, arrondie	NR
<i>Nematodirus sp</i>	1000 - 1500	Longue, filamenteuse	8	Assez nettes	Large, arrondie	Queue de la larve échancrée, bilobée ou trilobée
<i>Oesophagostomum sp</i>	750 - 800	Longue, filamenteuse	21	Assez nettes	Large, arrondie	NR
<i>Chabertia</i>	750 - 800	Longue, filamenteuse	32	Assez nettes	Large, arrondie	NR
<i>Bunostomum</i>	550 - 570	Longue, filamenteuse	16	Peu distinctes	NR	NR
<i>Strongyloides</i>	220 - 250	Absence de gaine	16 à 32	NR	NR	Œsophage très long

NR : Non renseigné

5.2. Diagnostic sur l'animal mort

Une autopsie permet le diagnostic par le dénombrement des strongles dans la caillette. Ils sont identifiés grâce à leur couleur rouge-rosé et par leur taille de 10 à 30 mm de long. Des lésions hémorragiques, des nodules blanchâtres, des petits ulcères et une hypertrophie de la muqueuse sont présents à certains endroits de la caillette.

5.3. Dans l'herbe

Le dénombrement des larves L3 de strongles peut aussi être réalisé en prélevant une centaine de pincées d'herbe au ras du sol afin d'obtenir un échantillon global de 200 à 250g [12].

6. Moyens de lutte contre les strongles gastro-intestinaux chez les ovins

Le contrôle des strongyloses gastro-intestinales est un enjeu majeur pour la rentabilité des élevages d'ovins. La mise en place de plans de prophylaxie est indispensable. Pendant

de nombreuses années, l'emploi de molécules anthelminthiques de synthèse a été le moyen quasi-exclusif de lutte contre ces parasites. En effet, les anthelminthiques présentent de multiples avantages : efficacité sur un large spectre d'espèces de nématodes parasites, faible coût et une simplicité d'utilisation [15]. L'objectif de ces traitements n'est toutefois pas de faire disparaître complètement les parasites mais de limiter leur impact économique dans les élevages. La persistance d'une population parasitaire résiduelle demeure favorable dans le sens où elle permet le développement de mécanismes immunitaires protecteurs.

6.1. Phénothiazine

Cette molécule **(1)** (Figure 5) commerciale a été décrite par Swales en 1939 au Canada [16] comme étant très efficace sur les vers *Haemonchus contortus* parasitant les moutons. L'activité est sélective sur les vers femelles, probablement due à leur alimentation ou à des effets génitaux. Aucune toxicité n'a été mise en évidence à cette époque. En 1957, des études menées par Drudge et al. [17], mettent en évidence l'apparition d'une résistance vis à vis de cette molécule. De plus, en 1973 [18], des effets toxiques à dose thérapeutique ont été révélés. Une photosensibilisation causée par le sulfoxyde de phénothiazine provoque de l'eczéma. Cette molécule n'est plus utilisée aujourd'hui.

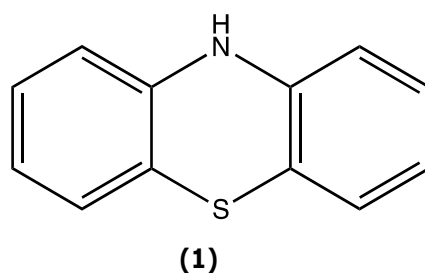


Figure 5 : Structure de la Phénothiazine **(1)**

6.2. Les anté-endectocides

Les anté-endectocides sont utilisés pour le traitement et la prévention des infestations. Trois groupes sont décrits selon leur structure chimique et leur mode d'action.

6.2.1. Les benzimidazoles et les pro-benzimidazoles

Ces deux types de molécules sont efficaces contre les strongles gastro-intestinaux et aussi contre les strongles respiratoires et les douves. Cette famille regroupe les anthelminthiques les plus utilisés à travers le monde [19].

a) Les molécules

Les pro-benzimidazoles sont des prodrogues : thiophanate (**2**), nétobimine (**3**) et febantel (**4**) (Figure 6). Ces molécules nécessitent d'être converties en molécules actives de benzimidazoles par des réactions enzymatiques se déroulant chez l'hôte.

Les benzimidazoles utilisés dans le traitement contre *Haemonchus contortus* chez les ovins sont les carbamates : albendazole (**5**), oxfendazole (**6**), oxibendazole (**7**), fenbendazole (**8**) et mebendazole (**9**), et le thiabendazole (**10**) présentés (Figure 7).

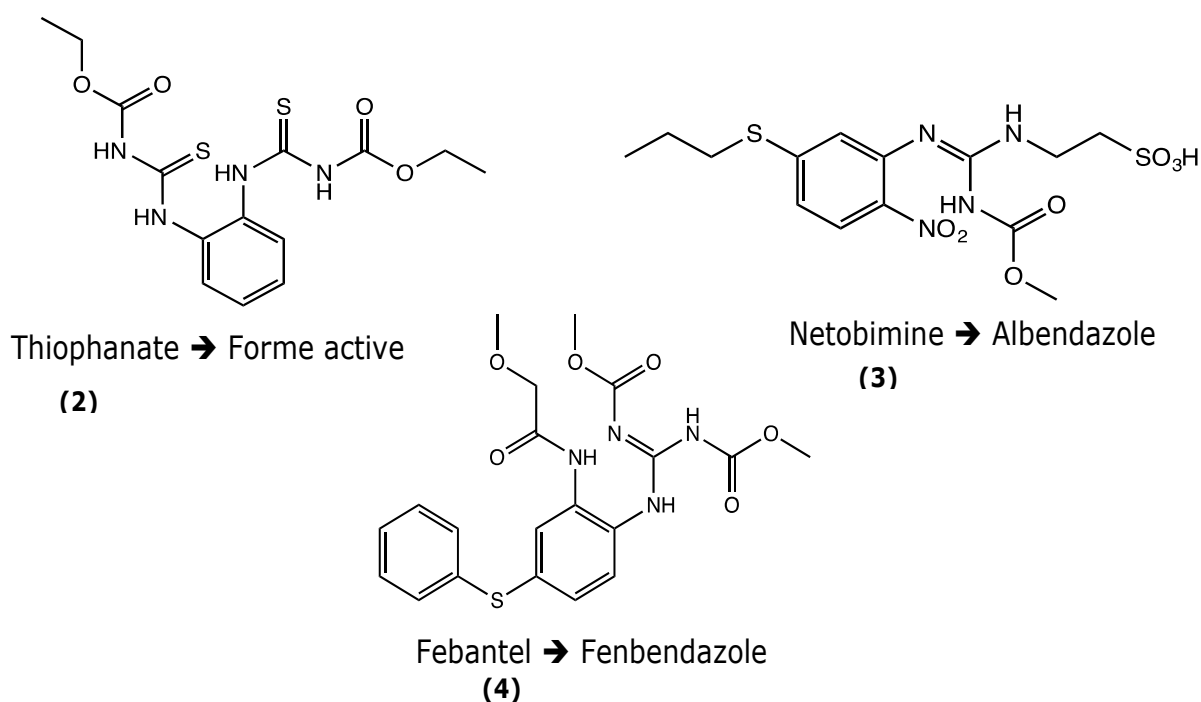


Figure 6 : Structures chimiques des pro-benzimidazoles (**2** à **4**)

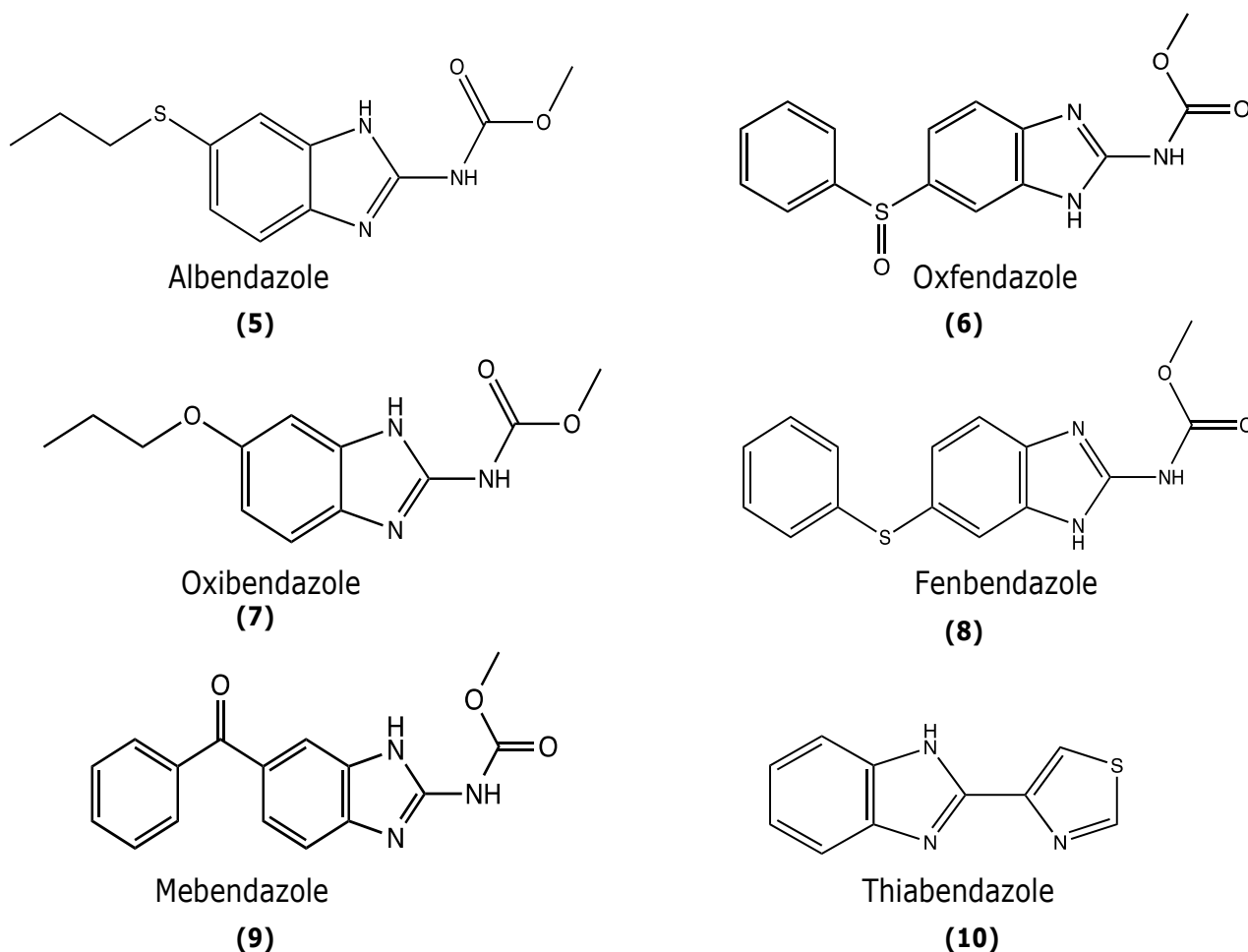


Figure 7 : Structures chimiques des benzimidazoles (5 à 10)

b) Mode d'action [20]

Ces molécules exercent une activité anthelminthique en inhibant la polymérisation des tubulines* et leur incorporation dans les microtubules (Figure 8). La liaison benzimidazole-microtubules du nématode est spécifique [21]. Ce sont des compétiteurs de la colchicine, conduisant ainsi à un dysfonctionnement cellulaire :

- inhibition de la sécrétion des protéines ;
- inhibition de la production des microtubules ;
- inhibition de la capture du glucose ;
- épuisement du glycogène.

L'absorption du glucose par les parasites étant bloquée, leur métabolisme énergétique est alors interrompu, ce qui provoque la mort du parasite.

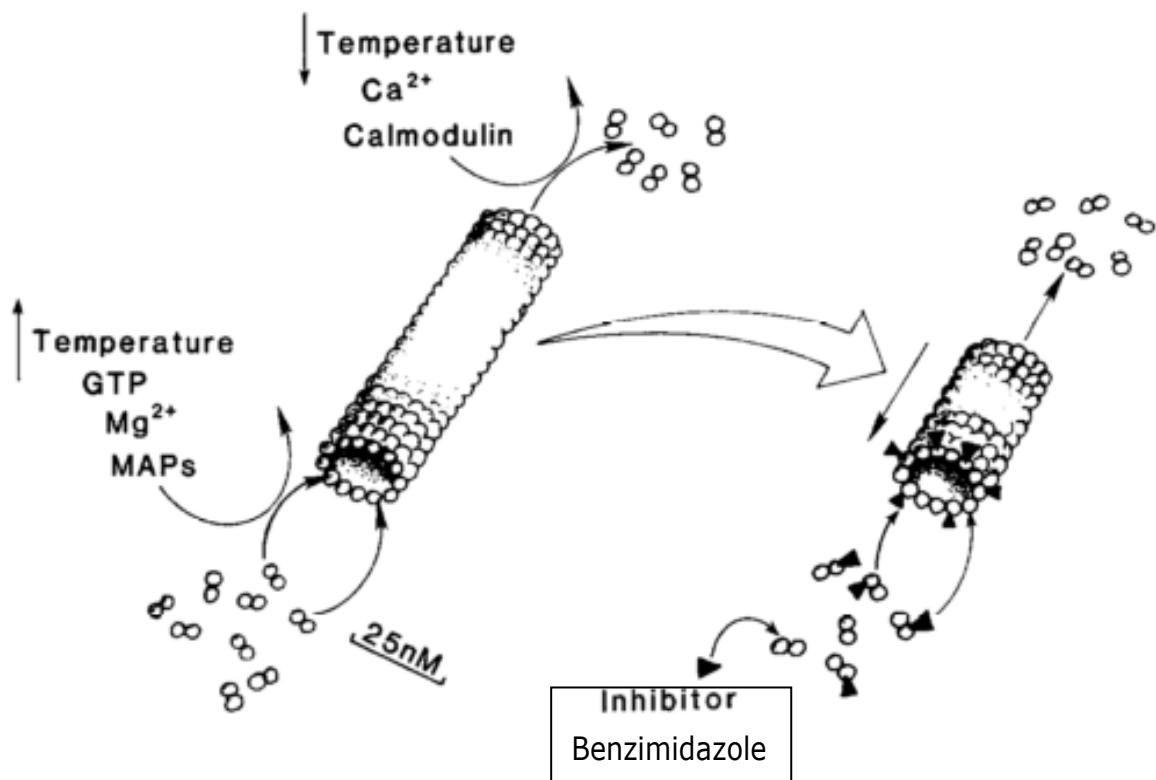


Figure 8 : Mode d'action des benzimidazoles [20]

c) Propriétés physico-chimiques

Ces molécules se présentent sous forme de poudre cristalline amorphe, blanche et stable à la chaleur. Leurs masses moléculaires varient entre 200 et 450 Daltons. Elles sont peu liposolubles et très peu hydrosolubles, ce qui est un facteur limitant pour le devenir dans l'organisme.

d) Formes pharmaceutiques

L'administration se fait par voie orale sous forme de comprimé, de solution buvable ou de bolus [22]. En médecine vétérinaire, un bolus s'administre par voie orale.

e) Métabolisme [23]

L'absorption intestinale de ces molécules dépend de leur solubilité dans l'eau. Comme décrit précédemment, elles sont très peu hydrosolubles. Leurs concentrations plasmatiques ne reflètent donc pas toujours les doses administrées per os. Leur métabolisation et leur élimination varient d'un composé à l'autre. Les benzimidazoles soufrés sont oxydés sous forme de sulfoxyde ou de sulfone. Les benzimidazoles carbamates, possédant un groupement kéto, sont réduits en alcools.

Les métabolites hydroxylés sont directement excrétés dans la bile sous formes libres ou conjuguées. Pour les autres composés, l'élimination peut être fécale ou urinaire. Il en résulte des temps d'attente variables pour la lactation selon les préparations et les principes actifs. Les pro-benzimidazoles sont métabolisés en benzimidazoles. Ils ont une marge de sécurité très élevée.

f) Spectre d'action

Seuls le febantel (pro-benzimidazole), fenbendazole et l'oxfendazole disposent de délais d'attente nuls pendant la lactation chez les petits ruminants. C'est pour cette raison que les benzimidazoles sont les anthelminthiques les plus utilisés dans les élevages laitiers.

g) Toxicité

Les benzimidazoles possèdent des indices thérapeutiques élevés. La toxicité faible est expliquée par leur faible hydrosolubilité et donc une quantité absorbée trop faible pour être toxique.

L'effet secondaire le plus retrouvé parmi ces molécules est la tératogénicité* provoquant des malformations squelettiques des os longs, variant en fonction de la structure des composés. Chez la brebis, le traitement lors de la période de gestation est critique pour l'effet tératogène entre le 10^{ème} et le 25^{ème} jour de gestation [24].

D'autres effets secondaires communs aux médicaments de cette famille sont des troubles gastro-intestinaux.

6.2.2. Les imidazothiazoles et tétrahydropyrimidines

Bien que ces deux familles aient des structures différentes, les molécules ont le même mode d'action.

a) Les molécules

Ce groupe réunit le lévamisole (**11**) et le tétramisole (**12**) pour les imidazothiazoles (Figure 9) et morantel (**13**) et pyrantel (**14**) pour les tétrahydropyrimidines (Figure 10). Le tétramisole est un mélange racémique 50/50 des deux isomères D et L alors que le lévamisole est l'isomère L pur [25].

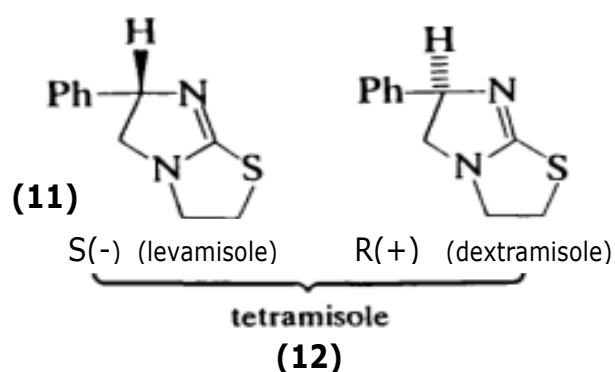


Figure 9 : Structure chimique des imidazothiazoles : levamisole **(11)** et tétramisole **(12)** [25]



Figure 10 : Structures chimiques des tétrahydropyrimidines **(13)** et **(14)**

b) Mode d'action

Ces molécules agissent par effet cholinomimétique en tant qu'agonistes des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine au niveau des synapses des cellules musculaires du parasite. Ils bloquent la conduction neuromusculaire des parasites par ouverture des canaux sodiques, provoquant une dépolarisation permanente au niveau des plaques motrices. Le résultat est une paralysie spastique irréversible et la mort du parasite (Figure 11) [35].

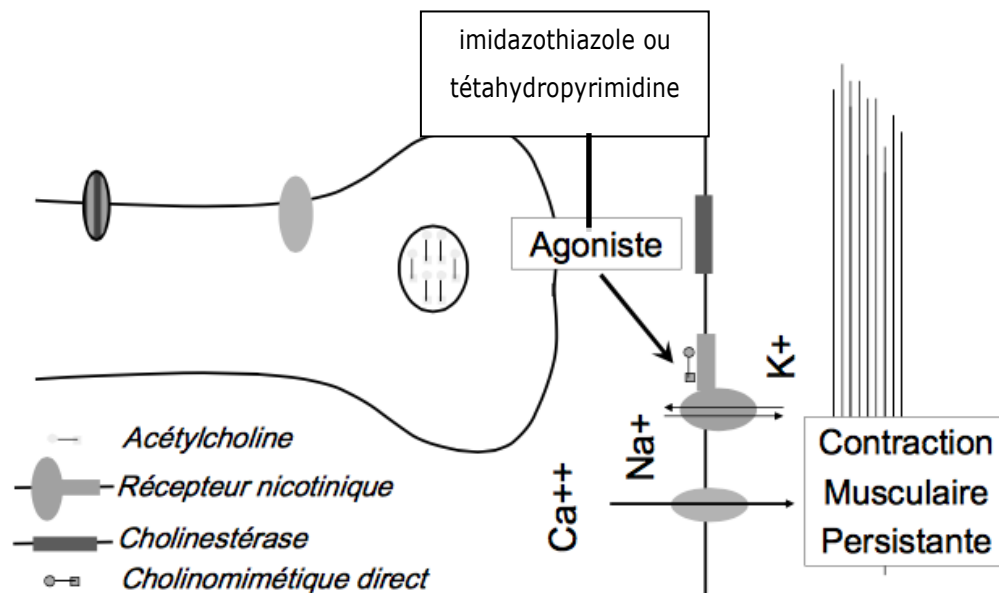


Figure 11 : Action d'un cholinomimétique direct (imidazothiazoles ou tétrahydropyrimidines) dans une synapse nicotinique [27]

c) Propriétés physico-chimiques

Ces molécules se présentent sous forme de poudre cristalline blanche, instable à la lumière. Leurs masses moléculaires varient entre 206 et 240 Daltons. Elles sont liposolubles et peu hydrosolubles. Ces molécules sont basiques et peuvent ainsi former des sels : chlorhydrates, qui eux sont hydrosolubles [27].

d) Formes pharmaceutiques

L'administration des tétrahydropyrimidines se fait par voie orale uniquement, sous forme de comprimés, poudres ou pâtes. Il existe une forme à libération prolongée pour le morantel : Paratect Flex®. Les imidazothiazoles s'administrent sous forme de chlorhydrates en intramusculaire et en sous cutanée ou par voie orale sous forme de base en libération prolongée [27]. Le pyrantel existe seul (Sepantel®, Strongid®) ou associé à un autre anthelminthique.

e) Métabolisme

Imidazothiazoles

Le lévamisole est rapidement et presque totalement résorbé dans le tractus digestif. Ce médicament est métabolisé dans une très large proportion au niveau du foie. Il est excrété dans les urines sous forme inchangé ou sous forme de métabolites.

Tétrahydropyrimidines

Le pamoate de pyrantel est quasiment insoluble dans l'eau et donc très peu absorbé au niveau du tractus digestif (moins de 10%). Sa rémanence* dans la lumière des intestins lui permet alors d'exercer pleinement son action contre les parasites.

Le tartrate de pyrantel est quant à lui soluble dans l'eau et son absorption au niveau digestif est supérieure à celle du pamoate (environ 30%).

La métabolisation de ces molécules est essentiellement réalisée au niveau du foie puis elles sont éliminées en majorité dans les selles et l'urine. En revanche, elles ne sont que très peu retrouvées dans le lait. L'administration du médicament peut se faire au même moment que la nourriture, ce qui retarde le passage dans le tractus digestif et prolonge ainsi le temps de contact entre la molécule et le parasite, améliorant ainsi son efficacité.

f) Spectre d'action

L'activité de cette famille de molécules est spécifique et leur spectre d'action étroit. Ces composés sont utilisés contre les strongles digestifs et respiratoires.

g) Toxicité

Etant très peu absorbées au niveau digestif, il est donc compréhensible que la toxicité de ces deux familles de molécules soit faible. Concernant la toxicité aiguë, les signes d'intolérance sont rares et il s'agit principalement de vomissements, de tremblements et des douleurs. En cas de surdosage du lévamisole, des nausées, des vomissements, un larmoiement, de l'hyperesthésie*, de l'anorexie et des douleurs abdominales peuvent être observés. L'atropine peut alors servir d'antidote.

6.2.3. Phénols halogénés

a) Les molécules

Deux phénols halogénés sont employés en thérapeutique contre *Haemonchus contortus* chez les ovins [26]: le premier est le nitroxinil (**15**) et le second, un salicylanilide, est le closantel (**16**) (Figure 12).

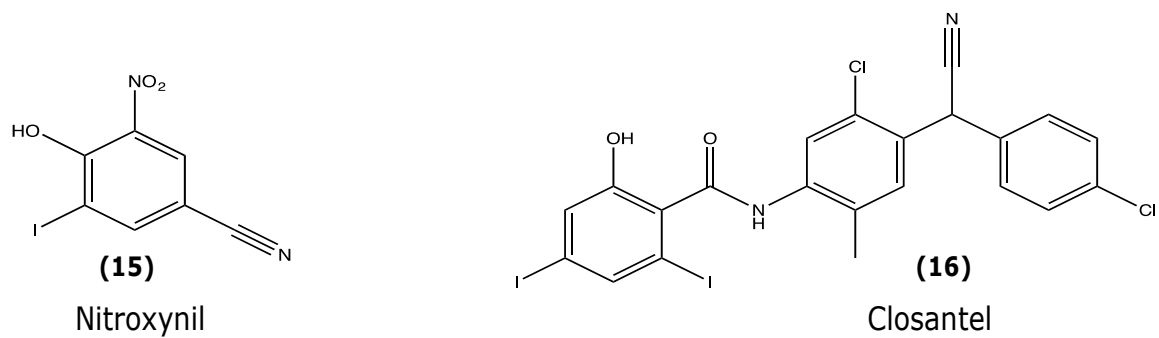


Figure 12 : Structure chimique d'un salicylanilide, le closantel (**15**) et d'un phénol halogéné, le nitroxynil (**16**)

b) Mode d'action

Ces molécules perturbent le gradient de protons entre les différents compartiments au sein de la mitochondrie du parasite (Figure 13). Ce gradient est responsable de l'énergie cellulaire. En découplant la phosphorylation oxydative mitochondriale, les molécules provoquent une inhibition de la formation d'ATP. Le métabolisme énergétique est alors fortement ralenti, ce qui conduit à la mort du parasite.

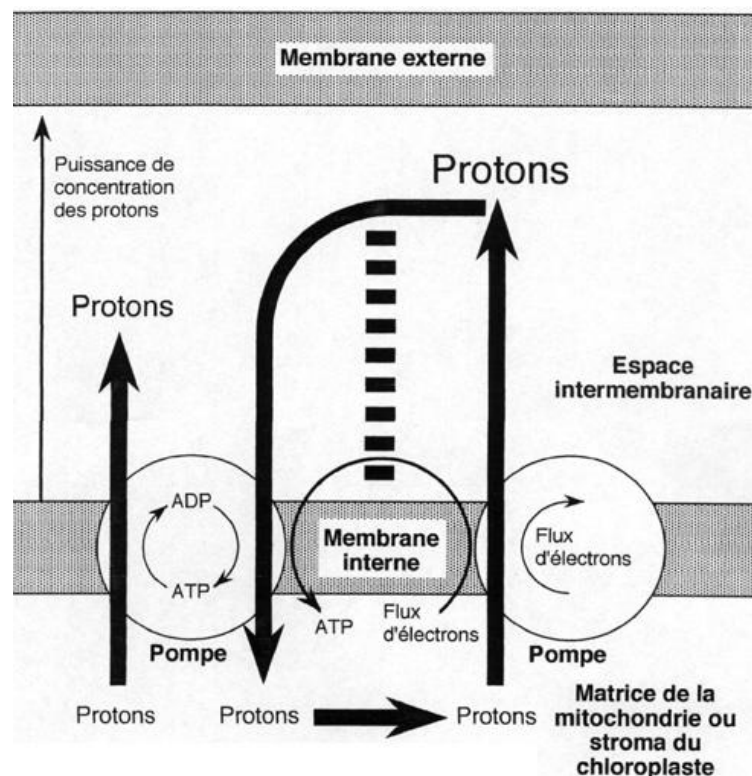


Figure 13 : Mode d'action des phénols halogénés : phosphorylation oxydative mitochondriale [28]

c) Propriétés physico-chimiques

Le closantel, de masse moléculaire 663 Daltons, est très lipophile et se comporte comme un acide faible ($pK_a = 4,28$) [29].

d) Formes pharmaceutiques

Le nitroxinil est utilisé par voie orale ou en sous-cutanée. Le closantel s'administre quant à lui soit par voie orale soit en intramusculaire chez les ovins [29].

e) Métabolisme

Le nitroxinil, injecté, se lie très fortement et presque complètement aux protéines plasmatiques ($> 97\%$). Les concentrations dans le sang sont sensiblement plus élevées que dans les tissus, ce qui lui confère une activité prolongée et une bonne efficacité sur les parasites hématophages tels qu'*Haemonchus contortus*. Le nitroxinil est excrété par le foie sous forme inchangé. Ainsi, des concentrations élevées se retrouvent dans les voies biliaires. Le métabolisme du nitroxinil et son excrétion par les fèces et l'urine sont assez lents [30].

Le closantel est rapidement absorbé par la circulation sanguine. Il n'est pratiquement pas métabolisé par le foie et est principalement excrété par voie biliaire [29].

f) Spectre d'action

Le closantel est actif contre les strongles hématophages et contre la grande douve du foie [19].

g) Toxicité

La marge de sécurité est relativement faible pour le nitroxinil. Des effets indésirables locaux, tels qu'un gonflement tissulaire, peuvent s'avérer douloureux, mais disparaissent généralement en une journée. Il est recommandé de ne pas utiliser ce produit chez les femelles lors de la lactation en raison de la présence de résidus dans le lait [30].

Une atteinte oculaire pouvant entraîner une cécité a été reportée [29] pour le closantel.

6.2.4. Bilan sur les anté-endectocides

En augmentant la dose, en la fractionnant ou en la répétant de façon journalière, le spectre d'action peut être élargi. La plupart ont un effet ponctuel, sans rémanence excepté pour le closantel, le nitroxylinil, et le pyrantel.

6.3. Les endectocides

6.3.1. Les lactones macrocycliques

a) Les molécules

Cette famille regroupe les avermectines dont l'abamectine **(17)** (Figure 14) [31], l'ivermectine **(18)**, la doramectine **(19)** et l'éprinomectine **(20)** dont **(17)**, **(18)** et **(20)** sont composées de 80% B_{1a} + 20% B_{1b}, et les milbémycines dont la moxidectine **(21)**. Leur structure chimique comprend de nombreux hétérocycles lactones. Appelées endectocides [15], ces substances sont actives sur les nématodes gastro-intestinaux et sur certains ectoparasites (acariens ou insectes). Produits naturels, les avermectines, sont issues de la fermentation de *Streptomyces avermilitis* et la moxidectine est issue de la fermentation de *Streptomyces cyanogriseus* [31].

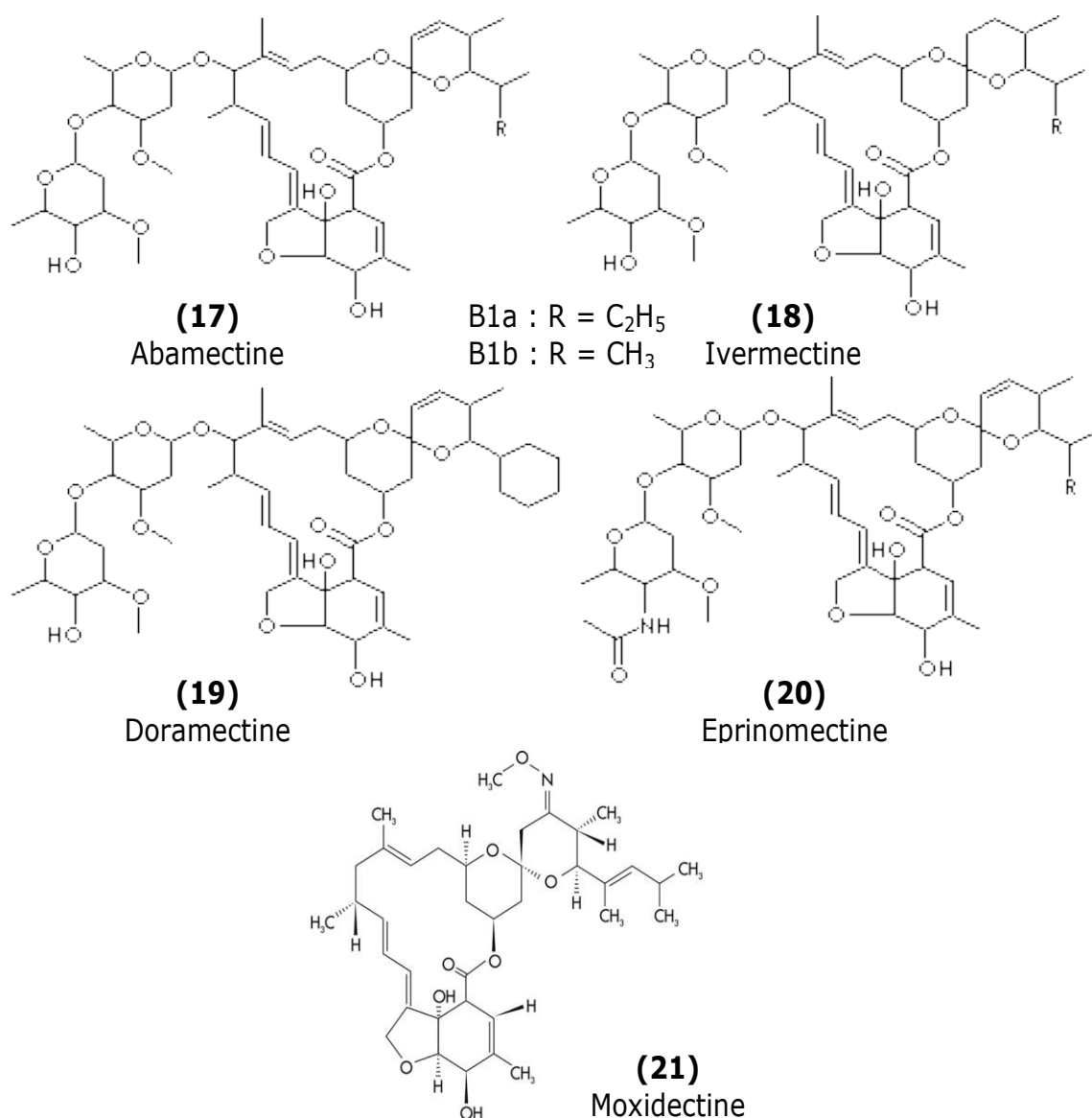


Figure 14 : Structures chimiques des avermectines et milbémycine (**17** à **21**)

b) Mode d'action

Ces molécules se fixent sélectivement aux récepteurs du glutamate, avec une haute affinité, activant ainsi les canaux chlorures glutamate-dépendants (GluCl) présents dans les cellules nerveuses ou musculaires des invertébrés (Figure 15). Une hyperpolarisation de ces cellules est provoquée par la membrane cellulaire devenue plus perméable aux ions chlorure. La paralysie du parasite est alors entraînée.

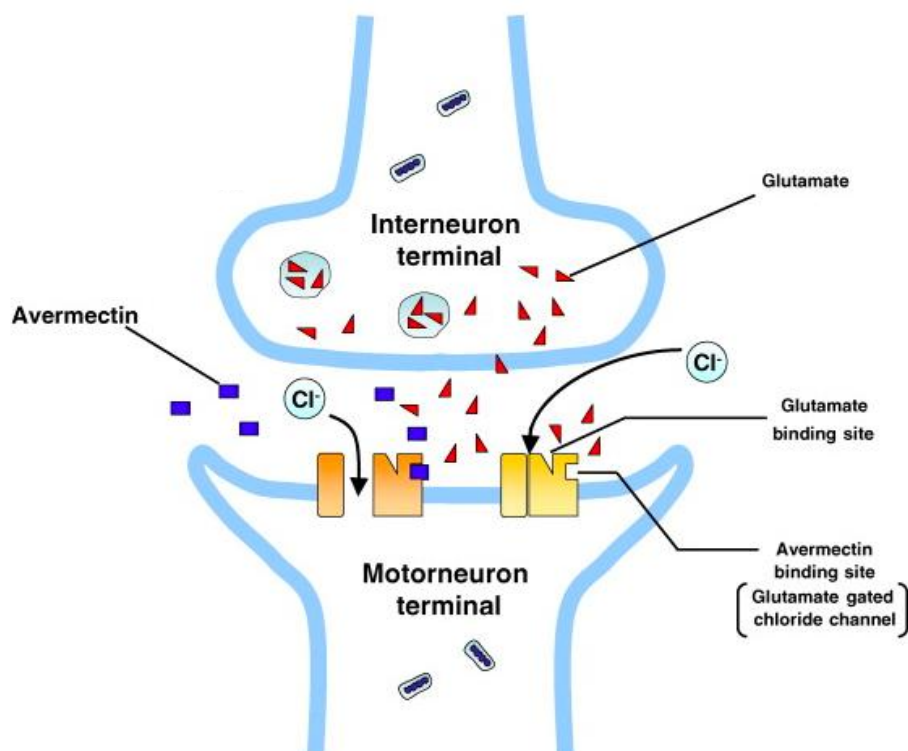


Figure 15 : Mode d'action des avermectines dans la synapse nicotinique du nématode [32]

c) Propriétés physico-chimiques

Ces molécules, qui ont des masses moléculaires allant de 700 à 1000 daltons, sont très lipophiles mais très peu hydrosolubles. Elles sont stables en milieu anhydre, mais instables aux UV en milieu aqueux [27].

d) Formes pharmaceutiques

Les avermectines peuvent être administrées sous différentes formes pharmaceutiques : comprimé (0,4mg/kg), injection sous cutanée (0,2mg/kg) et pour-on* (0,5mg/kg). Cependant, une étude a montré que la voie orale ne permettait pas de retenir l'établissement d'une nouvelle infection après un jour alors que les deux autres formes

permettent d'empêcher la mise en place d'une nouvelle infection jusqu'à 14 jours après l'initiation du traitement [33].

La moxidectine de la famille des milbémécines est administrée par voie orale.

e) Métabolisme

Ces molécules lipophiles diffusent très bien dans tous les tissus. Un stockage dans le tissu adipeux et le foie permet une libération progressive et donc une certaine rémanence du produit après administration. La phase d'absorption est plus ou moins lente selon la voie d'administration choisie. Ces substances sont ensuite stockées essentiellement au niveau des tissus adipeux et du foie. Malgré la forte liposolubilité, de faibles taux sont retrouvés dans le système nerveux central. L'élimination se fait majoritairement par voie fécale [27].

f) Spectre d'action

L'éprinomectine est largement utilisée puisqu'elle a un spectre d'action et une marge de sécurité très large ainsi qu'une concentration faible dans le lait, autorisant ainsi son utilisation pendant la lactation [19]. L'éprinomectine sous forme pour-on*, Eprinex®, est alors utilisée car elle possède un temps d'attente nul dans le lait. En revanche, les autres molécules sont interdites pendant la lactation car leur élimination se fait sous forme active dans le lait pendant plusieurs semaines.

g) Toxicité

Les avermectines sont plus concernées par cette toxicité que les milbémécines. Lors de surdosages importants, des signes d'ataxie*, de léthargie, de mydriase, d'hypothermie, de tremblements allant jusqu'au coma et à la mort peuvent être observés.

6.3.2. Bilan sur les endectocides

Les endectocides sont les anthelminthiques les plus utilisés en raison de leur spectre d'action large et de l'existence d'une rémanence. De plus, de nombreuses formes galéniques sont disponibles.

Cependant, l'utilisation abusive et non contrôlée de ces anté-endectocides et des endectocides a engendré l'émergence de résistances multiples et croisées, les rendant le plus souvent inefficaces. De plus, certains médicaments sont utilisés hors-AMM [30] tels

que Ivermec® et le thiabendazole. Il existe aussi des associations de médicaments : Closamectine® = 5mg/mL closantel / 125mg/mL ivermectine.

6.4. Bilan sur les anthelminthiques de synthèse

Un bilan des molécules utilisées comme AHs sur *Haemonchus contortus* chez les ovins est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des traitements utilisés pour les strongyloses digestives sur les ovins [12] [18] [22] [23][34]

Groupe	DCI	Nom commercial	Posologie (mg/kg)			Strongyloses digestives	
			VO	SC/IM	TC	Adulte	Larve inhibée
BENZIMIDAZOLES							
Thiazolyl-benzimidazoles	Thiabendazole	Hors AMM [18]	50			++	
Méthyl-carbamates	Oxibendazole		10-15			++	
	Mébandazole	Multispec® Supaverm®	10-15			++	
	Albendazole	Disthelm®	3,8			++	+
	Fenbendazole	Panacur®	7,5			++	+
	Oxfendazole	Dolthene® Oxfenil®	5			++	+
Pro-benzimidazoles	Thiophanate	Strongylate®	50-60			++	+
	Fébantel	Rintal®	5-7,5			++	+
	Nétobimine	Hapadex®	7,5-20	12,5		++	+
IMIDAZO-THIAZOLES							
	Tétramisole		10-15			++	+
	Lévamisole	Capizol®	5-7,5	3-5	10	++	++
TETRAHYDRO-PYRIMIDINES							
	Morantel	Paractect Flex®	12,5 (5,9)			++	
	Pyrantel (tartrate)		12,5-20			++	
LACTONES MACROCYCLIQUES							
Avermectines	Ivermectine	Ivermec (Hors AMM) Noromectin® Oramec®		0,2		++	++
	Abamectine	Enzec®		0,2			
	Doramectine	Dectomax®		0,2			
	Eprinomectine	Eprinex®			0,5pour -on		
Mylbémeycine	Moxidectine	Cydectine®	0,2	0,5			
SALICYLANILIDES							
	Closantel	Flukiver®	5				
	Nitroxinil	Dovénix®	10				

DCI : dénomination Commune Internationale VO : Voie Orale ; SC : Sous cutanée ; IM : Intra-Musculaire ; TC : Trans-cutanée ; ++ : excellente efficacité ; + bonne efficacité

Cependant, lors de la lactation des ovins, certaines molécules sont à proscrire dues à leur délai d'attente variable dans le lait (Tableau 4).

Tableau 4 : Temps d'attente des principaux anthelminthiques strongylicides chez les petits ruminants [19]

Molécules	Temps d'attente des molécules dans le lait
Thiabendazole	6 traites*
Mébandazole	Interdit**
Albendazole	Interdit**
Fenbendazole	nul
Oxfendazole	nul
Thiophanate	6 traites*
Fébantel	nul
Nétobimine	Interdit**
Lévamisole	Interdit**
Ivermectine	Interdit**
Doramectine	Interdit**
Moxidectine	Interdit**
Eprinomectine	nul
Closantel	Interdit**

*Nombre de traites avant de pouvoir consommer le lait

**Interdit chez les femelles laitières en lactation dont le lait ou ses dérivés sont destinés à la consommation humaine.

7. Prévention

La prévention de cette haemonchose peut être contrôlée. Dans les systèmes d'élevage, les ovins s'infestent avec des strongles gastro-intestinaux lors du pâturage à différents degrés. La réalisation d'une conduite alternée des moutons sur les prairies contaminées et les prairies saines, est mise en œuvre afin de contrôler l'infestation des animaux. L'utilisation de traitement peut aussi être intégrée dans les systèmes d'élevage. Pour la prévention, deux catégories de traitements sont utilisées : strongylicides à action immédiate ou à action rémanente. Les strongylicides à action immédiate ne permettent pas de protéger de la ré-infestation lors du pâturage dans les prairies contaminées. La ré-infestation est contrôlée par les strongylicides à action rémanente [35].

7.1. Les strongylicides à action immédiate

Ces médicaments détruisent les strongles gastro-intestinaux présents chez le mouton dans les trois à sept jours après leur administration. Leur utilisation est à réaliser avant la lutte et à l'entrée en bergerie. Ils ne protègent pas contre les ré-infestations lorsque les

moutons sont maintenus dans des prairies contaminées. Les molécules utilisées sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Anthelminthiques à action immédiate

Famille	DCI
Benzimidazoles	Albendazole
	Fenbendazole
	Mébendazole
	Oxibendazole
	Oxfenbendazole
	Thiabendazole
Guanidine	Fébantel
Imidazothiazole	Lévamisole
Nitrophénylguanidine	Nétobimine

7.2. Les strongylicides à action rémanente

Ces médicaments éliminent les strongles gastro-intestinaux présents à différents stades et empêchent toute ré-infestation de sept à trente jours après administration selon la rémanence du produit. De plus, ils contrôlent la ré-infestation des moutons par les larves infestantes qui ont pu être ingérées avec l'herbe. Ce type de traitement est utilisé en automne en tenant compte de la durée d'efficacité du médicament et de son spectre d'activité. Les molécules utilisées sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Anthelminthiques à action rémanente

Famille	DCI	Durée de rémanence
Avermectine	Ivermectine	15 – 21 jours
	Doramectine	28 jours
Milbémycine	Moxidectine	35 jours
Salycinalinide	Closantel	6 à 8 semaines
Benzimidazole	Albendazole bolus	100 jours

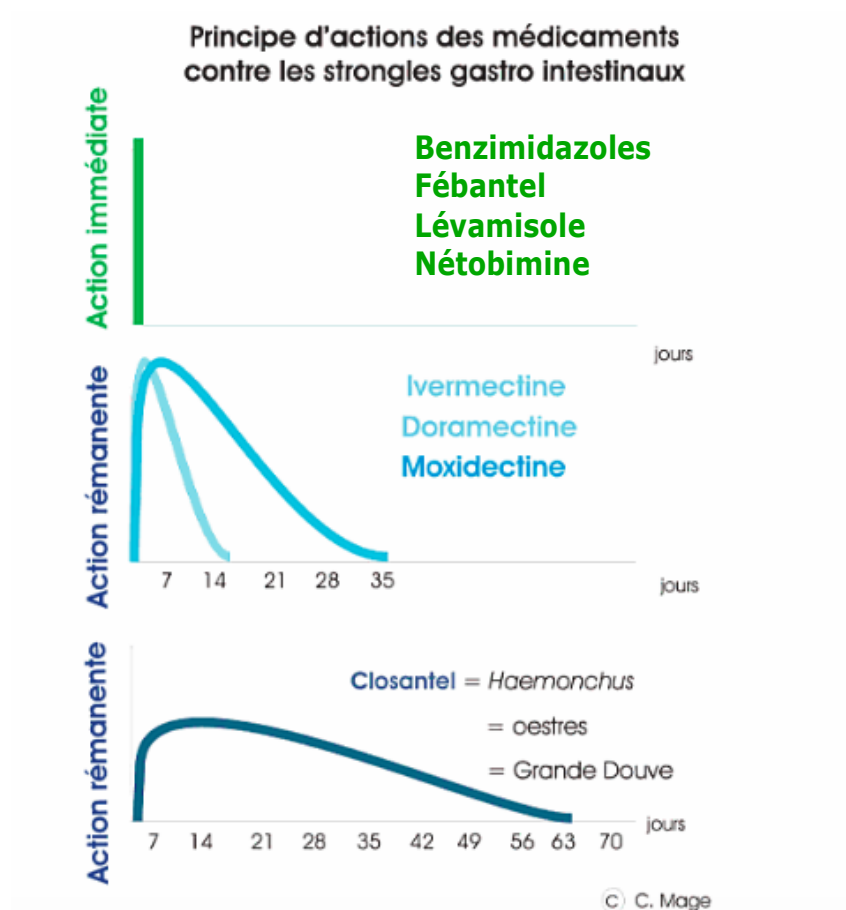


Figure 16 : Principes d'action des médicaments contre les strongles gastro-intestinaux [36]

8. Apparition de résistances

8.1. Définition de la résistance

Le phénomène de chimiorésistance est décrit comme une capacité, acquise génétiquement, d'individus d'une population à résister à des doses d'antiparasitaires normalement létales pour la majorité des individus de cette espèce [19].

Une résistance se traduit ainsi par toute diminution de la réponse au traitement chez une population sensible, selon Coles [37]. Elle est dite complète lorsque la dose maximale de médicament pouvant être tolérée par l'hôte n'a pas d'effet. Il s'agit d'une préadaptation par mutation dont le déterminisme est génétique et la transmission héréditaire. L'utilisation de cet anthelminthique exerce une pression de sélection qui permet aux individus naturellement résistants de survivre et de se reproduire.

On parle de résistance simple lorsqu'elle concerne une seule molécule et de résistance multiple lorsque celle-ci s'applique à plusieurs familles chimiques ayant des modes d'action différents. La résistance de famille s'applique à une famille d'anthelminthiques

caractérisée par le même mode d'action. Le cas de la résistance de famille ou *side-resistance* est le plus fréquent. Lorsqu'une résistance à une molécule apparaît, elle concerne toute la famille à laquelle appartient cette molécule. Par exemple, si un strongle est résistant à l'albendazole, il l'est aussi à tous les benzimidazoles et pro-benzimidazoles. Cependant, il existe des résistances croisées caractérisant un helminthe résistant à plusieurs anthelminthiques à la suite de la sélection par un anthelminthique unique. Par exemple, l'existence d'une réaction croisée entre l'ivermectine et la moxidectine est suspectée [38].

Le calcul du facteur de résistance permet d'apprécier l'intensité de la résistance afin de caractériser une souche de parasites. C'est le rapport entre la dose létale (DL₅₀)* testée sur la souche suspecte et la DL₅₀ testée sur une souche sensible (Tableau 7).

$$FR = \frac{DL50 \text{ souche résistante}}{DL50 \text{ souche sensible}}$$

Tableau 7 : Intensité de la résistance selon le facteur de résistance

FR calculé	Souche
FR < 1	Sensible
1 < FR ≤ 5	Tolérante
FR > 5	Résistante

8.2. Parasites touchés par la résistance

Cette résistance aux anthelminthiques a été reportée chez les ovins, caprins, bovins et équidés. Plusieurs espèces de parasites sont touchées par ces résistances, notamment les parasites du tractus gastro-intestinaux. Chez les équidés, ce sont surtout les cyathostominés. *Haemonchus contortus* est l'espèce la plus incriminée chez les petits ruminants, suivi par *Teladorsagia* sp et *trichostrongylus* [39]. Dans le Tableau 8, les différentes espèces de parasites se sont montrées résistantes ou non selon l'anthelminthique utilisé [40]. Le parasite *Haemonchus contortus* a développé des résistances pour chaque type de traitement.

Tableau 8 : Espèces de parasites résistants aux principales classes d'anthelminthiques

Hôtes	Parasites	Benzidimi- dazoles	Imidazo- thiazoles	Avermectines	Salicylanilides	Organo- phosphorés
Ovins et caprins	<i>H.contortus</i>	+	+(rare)	+	+	+
	<i>Teladorsagia</i> sp	+	+	+	-	
	<i>Trichostrongylus</i> sp	+	+	+(rare)	-	
	<i>Nematodirus</i>	+			-	
Bovins	<i>Cooperia</i> sp	+		+	-	-
	<i>H.placei</i>	+	+			-
	<i>Teladorsagia</i>	+	+		-	-
	<i>Trichostrongylus</i> <i>axei</i>	+			-	-
Equidés	Cyathostomes	+	+(rare)		-	

+ indique la présence d'une résistance de l'espèce à une classe d'anthelminthique

- indique que l'espèce concernée est en dehors du spectre d'activité de l'anthelminthique

8.3. Historique de l'apparition des résistances

D'après la revue de Kaplan en 2004 [1], les résistances aux anthelminthiques ont été reportées au fur et à mesure. Chez les nématodes, ce sont les benzimidazoles qui sont le plus touchés par les résistances chez les ovins, caprins et équidés, comme décrit dans le tableau ci-dessus. Le Tableau 9 décrit l'apparition des résistances suite à l'utilisation de traitements anthelminthiques.

Tableau 9 : Tableau indiquant l'apparition de résistance aux différentes classes d'anthelminthiques suite à leur mise sur le marché

Anthelminthiques	Hôte	Parasite	Année de mise sur le marché ¹	1 ^{er} rapport de résistance publié ²	Réf
Benzimidazoles					
Thiabendazole	Mouton	Non renseigné	1961	1964	[41]
	Cheval	<i>Parascaris equorum</i>	1962	1965	³
Imidazothiazoles-tetrahydropyrimidines					
Levamisole	Mouton	<i>Trichostrongylus</i> <i>colubriformis</i> <i>Ostertagia circumcincta</i>	1970	1979	[42] [43]
Pyrantel	Cheval	Cyathostomes	1974	1996	[44]
Avermectine-Mylbémécines					
Ivermectine	Mouton	<i>Haemonchus contortus</i>	1981	1988	[45]
	Cheval	<i>Parascaris equorum</i>	1983	2002	[46]
Moxidectine	Mouton	<i>Ostertagia</i> sp	1991	1996	[47]
	Cheval	<i>Parascaris</i> sp	1995	2003	[47]

¹ La date exacte d'autorisation de mise sur le marché varie selon les pays.

² Ces dates correspondent aux premiers cas de résistance documentés. D'autres cas ont été reportés auparavant suspectant des résistances.

³ Résistance suspectée chez *Parascaris equorum* mais non confirmée.

La première résistance a été décrite par Drudge et al. en 1964 [41] concernant le thiabendazole utilisé chez le mouton. Une résistance au lévamisole, appartenant à la famille des imidazothiazoles - tétrahydropyridimidines, a été révélée en 1979 par Sangster et al. [42] puis analysée en 1980 par Prichard et al. [43]. Ce tableau révèle l'apparition des résistances souvent peut longtemps après l'utilisation de l'anthelminthique. Les benzimidazoles étaient les premiers sur le marché. Lorsqu'une résistance est apparue, d'autres classes ont été utilisées. Cependant, toutes les classes d'anthelminthique ont été touchées par ces résistances.

Ces traitements chimiques anthelminthiques ne répondent donc que partiellement à la problématique des infestations des ovins, caprins, bovins et équidés par les parasites intestinaux.

Afin de pouvoir éviter ces phénomènes de résistance, il est important de comprendre le mécanisme de résistance.

8.4. Mécanismes d'apparition des résistances

8.4.1. Facteurs de développement de résistance

a) Subthérapeutiques doses

Le sous-dosage est un autre facteur influençant ce développement de résistance. En effet, des doses subthérapeutiques permettent la survie des vers résistants hétérozygotes [18].

b) Utilisation d'un groupe d'anthelminthiques

L'usage fréquent du même groupe d'anthelminthique favorise ce développement. La résistance anthelminthique repose sur une mutation (modification brutale du matériel génétique du parasite) d'un ou plusieurs gènes. Ce phénomène héréditaire pré-adaptatif avec le ou les gènes de résistance présent(s) au sein de la population de parasites existe déjà naturellement avant même la première utilisation du médicament. L'usage de ce traitement sélectionne les individus possédant préalablement cette mutation et les individus résistants et il élimine les individus sensibles. La résistance apparaît donc comme une sélection suite à l'exposition de la population de parasites à un anthelminthique. Lorsque l'animal reçoit l'anthelminthique, les vers pouvant survivre sont ceux portant le gène de résistance [48]. Les vers survivants sont alors les seuls pouvant pondre des œufs ainsi le (ou les) gène(s) de résistance est (sont) alors développé(s).

Les populations de nématodes parasites sont génétiquement hétérogène et donc en mesure de répondre aux pressions sélectives, notamment les vermifuges. La fréquence et le temps de traitement favorisent et sélectionnent des parasites porteurs de tolérance ou une résistance allèles. La vitesse à laquelle se propage la résistance chez le parasite dépend de nombreux facteurs.

8.4.2. Mécanisme pharmacologique

La pharmacologie permet d'expliquer l'action des médicaments. Elle regroupe la chimie, la pharmacocinétique, la pharmacodynamie et la nature des récepteurs incluant la liaison aux ligands. Elle est à la fois un facteur de sélection pour la résistance à un médicament dans une population de parasites et permet aussi d'expliquer les caractéristiques de cette résistance. La compréhension de la pharmacologie de chaque classe d'anthelminthiques permet de mieux comprendre les résistances afin de les contrôler. Cela permettrait de quantifier, de comparer et de répertorier les résistances dans les populations parasites. Ces tests pourraient être basés sur des tests biologiques ou sur la *polymerase chain reaction* (PCR) des vers individuels. De plus, il existe une dérivation des paramètres tels que l'efficacité contre les différents stades parasitaires ou les génotypes qui sont des éléments importants pour les modèles mathématiques visant à concevoir des stratégies de contrôle de la résistance [49].

Après avoir fait un état des lieux sur la définition de la résistance, son historique et ses mécanismes de développement, il paraît indispensable de développer des alternatives à ces traitements anthelminthiques.

PARTIE II : Alternatives face aux phénomènes de résistance des anthelminthiques

1. Alternatives aux traitements médicamenteux dans la lutte contre les strongyloses

Aujourd'hui, le grand public se préoccupe d'avantage de l'utilisation de substances chimiques en agriculture et de la présence de résidus médicamenteux dans les biens de consommation [22]. Des règles d'utilisation des anthelminthiques de synthèse (AHs) ont été établies suite à l'inquiétude justifiée des consommateurs de produits d'origine animale contenant d'éventuelles traces de résidus de médicaments. Ces règles visent à limiter l'usage des AHs et à choisir parmi les différentes familles de molécules selon l'usage des animaux, notamment dans les vocations laitières. En effet, les restrictions d'emploi des AHs sont plus strictes durant la lactation car l'élimination de certains médicaments se fait *via* le lait. Des délais d'attente pour la consommation du lait sont alors dus à cette restriction. Certaines molécules sont donc interdites chez les femelles en lactation [50].

Les AHs, et plus particulièrement les lactones macrocycliques, sont toxiques pour les organismes responsables de la décomposition des fèces de ruminants au pâturage. Aussi, l'Union Européenne encourage les projets visant la recherche de solutions alternatives à l'utilisation d'anthelminthique de synthèse.

Il existe différentes méthodes alternatives sur la phase libre. La gestion du pâturage permet de casser le cycle de vie du parasite et le compostage du fumier permet de détruire les larves et les œufs des parasites par la chaleur émise, plutôt que de l'épandre dans les pâturages. Au niveau de la phase interne du parasite, il existe d'autres méthodes telles que la sélection d'hôtes génétiquement résistants aux strongles ainsi que la vaccination des troupeaux constituant un moyen de prévention. Cette dernière technique n'a pas été développée pour les helminthes, bien qu'une stimulation immunitaire soit obtenue suite à des infections naturelles ou expérimentales. Les mécanismes immunitaires mis en jeu lors de l'expulsion des Helminthes par les ruminants sont mal connus.

Enfin, la dernière méthode est le recours à une alimentation raisonnée : des fourrages riches en tanins peuvent être utilisés pour nourrir les bêtes. De nombreuses études tendent en effet à prouver l'efficacité des tanins et notamment des tanins condensés dans la lutte contre les helminthes [22].

2. Alternatives développées au laboratoire PHARMA-DEV

Dans le cadre des projets CARES et MYCOVAL, de récents travaux portant sur l'activité anthelminthique d'extraits de champignons, ont montré qu'ils pouvaient être à l'origine de découvertes prometteuses dans le domaine de la pharmacologie antiparasitaire [7]. Les métabolites secondaires issus des champignons sauvages pourraient donc être une source originale de nouveaux antiparasitaires.

Ces résultats préliminaires ont été approfondis pour consolider leur potentiel thérapeutique antiparasitaire afin d'envisager à terme la mise en place en Midi-Pyrénées d'une filière de mycothérapie : c'est l'objectif du présent projet MYCOVAL. Ce projet cherche à concevoir des procédés d'extraction des métabolites secondaires fongiques d'une vingtaine d'espèces de champignons sauvages dit oubliés de la région Midi-Pyrénées. Ces extraits et leurs métabolites ont été évalués dans le domaine pharmacologique sur des modèles biologiques, concernant principalement les parasites affectant les animaux d'élevage (nématodes gastro-intestinaux). Les objectifs de ce stage ont été d'évaluer l'activité anthelminthique d'extraits de macromycètes récoltés en Midi-Pyrénées, d'étudier la composition chimique de ces extraits et de corrélérer l'activité éventuelle à la présence de métabolites secondaires particuliers ainsi que d'isoler la (ou les) molécule(s) responsable(s) de cette activité biologique par fractionnement bio-guidé.

Afin de poursuivre les études menées sur le projet MYCOVAL, un travail expérimental s'est déroulé au laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV), à Toulouse.

3. Présentation du laboratoire PHARMA-DEV

Pharma-Dev est une unité mixte de recherche (UMR 152), entre l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Université Paul Sabatier de Toulouse. L'équipe de pharmacognosie, ethnopharmacologie et pathologies du Sud (PEPS) de l'UMR Pharma-DEV, étudie et valorise des substances naturelles issues de la biodiversité végétale et fongique ou leurs analogues obtenus par synthèse totale ou par héli-synthèse, à visée antiparasitaire, anti-infectieuse et anticancéreuse. Il s'agit d'une part de rechercher des nouvelles classes de métabolites qui pourront être potentiellement des candidats pour de futurs médicaments, et d'autre part de confirmer et valider les usages médicaux traditionnels et d'augmenter les connaissances chimio-taxonomiques dans une approche fondamentale.

4. Matériels biologiques étudiés



4.1. Classification

Selon le Guide des champignons de G. Eyssartier et P. Roux [51], les deux macromycètes présentés (Figure 17) et étudiés dans ce projet, sont classés parmi « les champignons à face inférieure tapissée d'aiguillons, ou entièrement constitués d'aiguillons, avec ou sans pied, parfois en simple croûte sur le bois mort ». Tous les deux, poussant au sol, possèdent un pied bien développé et une chair coriace. Ils se différencient par une sporée* blanche pour *Phellodon* alors qu'*Hydnellum* possède une sporée brune. Une comparaison détaillée est décrite (Tableau 10).



Figure 17 : Photographie des champignons *Hydnellum ferrugineum* (gauche) et *Phellodon niger* (droite)

Tableau 10 : Comparaison des deux champignons étudiés

	<i>Phellodon niger</i> (Fr. : Fr.) P.Karsten	<i>Hydnellum ferrugineum</i> (Fr. : Fr.) P.Karsten
Règne	<i>Fungi</i>	
Embranchement	<i>Basidiomycota</i>	
Ordre	<i>Thelephorales</i>	
Famille	<i>Bankeraceae</i>	
Chapeau	3-8 cm Feutré-méchuleux Zoné et irrégulier Bleu-noir ou noir à bord blanchâtre	3-10 cm Feutré Exsudant des gouttes rouges en cours de croissance Blanchâtre, rose à brun-rouge
Aiguillons	Décurrents Assez longs Gris bleuté à gris-brun	Peu décurrents Blanchâtre puis brun-rouge
Pied	2 - 6 x 0,5 - 1,5 cm Central ou +/- excentré Velouté, Noirâtre	1,5 - 5 x 0,5 - 3 cm Feutré Brun-rouge
Chair	Coriace +/- zonée Noirâtre	Coriace Zonée Brun-rouge
Spores	3,5 - 5,5 x 2,5 - 4 µm Elliptiques à globuleuses Incolores Ornées de verrues épineuses	5,5 - 7 x 4,5 - 5,5 µm +/- globuleuses Brun-jaune Ornées de bosses grossières
Saveur	Douce	
Odeur	Un peu épicé	Farineuse à la coupe
Comestibilité	Sans intérêt	
Fréquence	Peu commun	
Habitat	Sous feuillus et sous conifères	Sous conifères (pins, épicéas)
Répartition	 <p>Présence certaine Présence probable</p> <p>d'après [52]</p>	 <p>Présence certaine Présence probable</p> <p>d'après [52]</p>

4.2. Molécules isolées dans la littérature

Afin d'étudier la composition des champignons étudiés dans cette étude, il est nécessaire de faire un état des lieux des molécules isolées et identifiées.

4.2.1. *Phellodon niger*

En 2010, Fang et al., isolent trois nouveaux composés à partir de *Phellodon niger* et isolent un certain nombre de composés déjà identifiés. Les nigernines A et B (**22**) et (**23**) (Figure 18) sont deux nouveaux diterpènes de type cyathane et la phellodonine (**24**) est un nouveau dérivé terphényle nitrogéné. Des composés tels que l'acide phellodonique (**25**) déjà isolés auparavant dans *Phellodon melaleucus* [53], et le 2',3'-diacetoxy-3,4,5',6',4''-pentahydroxy-p-terphenyl (**26**) isolé chez *Sarcodon leucopus* (famille des *Bankeraceae* [54]) ont aussi été identifiés dans *Phellodon niger* dans cette étude de 2010. La grifoline (**27**), isolée à partir d'*Albatrellus dispansus* (embranchement des basidiomycètes) [55] et l'acide 4-O-methylgrifolique (**28**), déjà identifié dans *Polyporus dispansus* (embranchement des basidiomycètes) [56], ont également été retrouvés chez *Phellodon niger* dans cette étude de 2010 [57]. Les composés (**22**), (**23**), (**24**), (**26**) et (**28**) ont démontré une activité cytotoxique sur les cellules tumorales et une activité antioxydante [57].

En 2011, Fang et al [58], isolent à nouveau quatre nouveaux diterpènes de type cyathane, appelés nigernine C (**29**), D (**30**), E (**31**) et F (**32**). Ils retrouvent également trois composés déjà connus, la sarcodonine δ (**33**) [59], le 1,2-diacetoxy-3-(4'-hydroxyphenyl)-4,7,8-trihydroxy-dibenzo-furane (**34**) [60] et l'acide grifolique (**35**) [56].

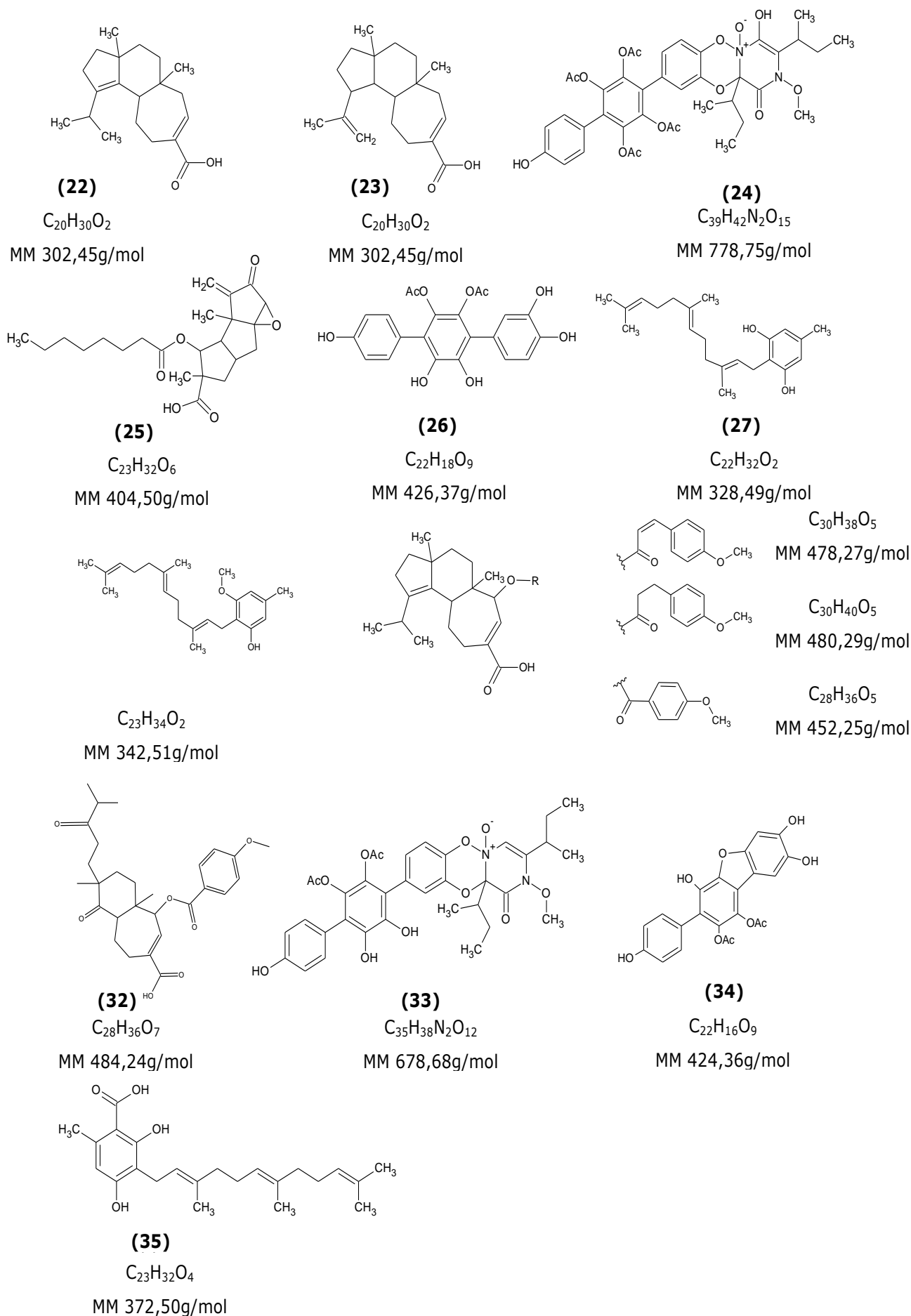


Figure 18 : Structures des composés identifiés chez *Phellodon niger*

4.2.2. *Hydnellum ferrugineum*

Deux pigments, l'hydnuferrogine (**36**) (Figure 19) et l'hydnuferroginine (**37**) ont été isolés par Gripenberg en 1974 [61] et en 1981 [62]. L'acide théléphorique (**38**) est aussi retrouvé dans cette espèce d'*Hydnellum* [61]. Gripenberg explique en 1974 qu'un précurseur commun, donne d'une part l'acide théléphorique par deshydrogénation et d'autre part l'hydnuferrogine par oxydation (Figure 20). Aucune activité n'a été reportée pour l'hydnuferrogine et pour l'hydnuferroginine. En revanche, l'acide théléphorique a révélé une activité inhibitrice de la prolyl endopetidase (PEP). Un taux anormal de PEP est supposé participé au développement d'une démence de type Alzheimer [63].

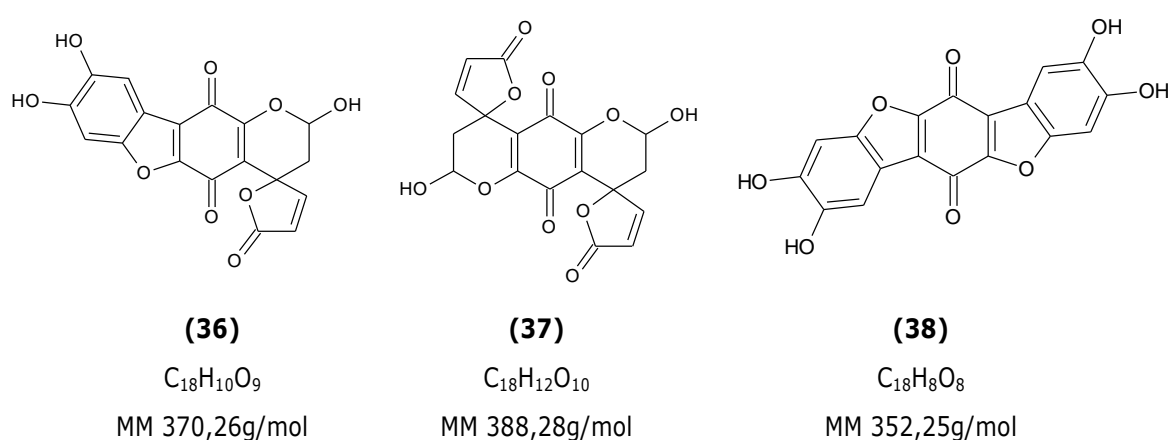


Figure 19 : Structures des composés identifiés chez *Hydnellum ferrugineum*

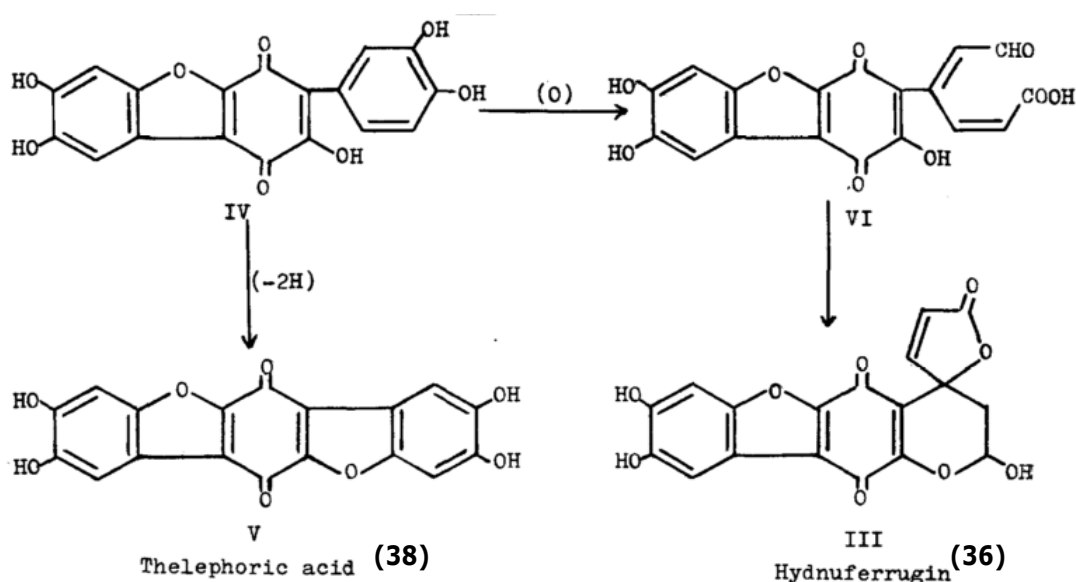


Figure 20 : Formation de l'acide théléphorique (**38**) et de l'hydnuferrogine (**36**) à partir d'un précurseur commun [61]

PARTIE III : Travaux expérimentaux : Etude chimiques et biologiques d'*Hydnellum ferrugineum* et *Phellodon niger*

1. Matériels et méthodes utilisés

1.1. Macromycètes

Hydnellum ferrugineum et *Phellodon niger*, récoltés dans la région Midi-Pyrénées à Aragnouet avant le tunnel de Bielsa ont été étudiés d'un point de vue biologique et chimique. Ils ont été identifiés par Louis Chavant, Professeur de mycologie émérite de la Faculté de Pharmacie de Toulouse (Université Paul Sabatier) et sont conservés dans une mycothèque.

1.2. Extraction

Chacun des champignons a été séché à l'air libre puis broyé à l'aide d'un moulin à café afin d'obtenir une poudre. Des extractions successives avec des solvants de polarité croissante (cyclohexane, dichlorométhane, méthanol et eau) ont été réalisées. Cent vingt grammes de poudre de champignon avec 1 L de solvant ont été introduits dans un ballon, préalablement pesé. Ce ballon a ensuite été porté au reflux, par un chauffe ballon et un réfrigérant à boules (Figure 21). Après 5h de reflux, le contenu du ballon a été filtré sur papier filtre. Le marc obtenu a été repris par le solvant suivant qui est plus polaire. Les phases organiques et hydroalcooliques ont alors été évaporées avec un évaporateur rotatif (Büchi R-114 couplé à une pompe à vide ILMVAC) afin d'obtenir les différents extraits secs. Ceux-ci ont été pesés et conservés dans des piluliers à température ambiante à l'abri de la lumière.

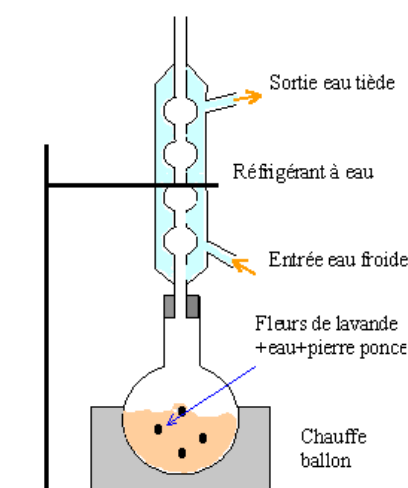


Figure 21 : Méthode d'extraction : montage au reflux

1.3. Evaluation de l'activité biologique des extraits sur *Haemonchus contortus*

Deux types de tests ont été réalisés à l'école vétérinaire. Le premier met en évidence le dégainement des larves et le second montre l'éclosion des œufs en larves. L'efficacité est mesurée par rapport à un témoin. Ces deux tests ont été réalisés sur une souche sensible d'*Haemonchus contortus* (JUAN) et sur une souche résistante (White River) aux anthelminthiques de synthèse : benzimidazoles et aux avermectines.

1.3.1. Test d'éclosion des œufs (EHA) [64][65][66]

a) Récupération des œufs

Des fèces intra-anus d'animaux infestés, ont été collectées et placées dans une passoire contenant de l'eau. Les fèces ont été soigneusement écrasées jusqu'à ce que les œufs soient transférés dans l'eau. Après filtration (avec 3 gazes hydrophiles les unes au-dessus des autres), le contenu a été réparti dans 4 tubes de 45mL et centrifugé à 2500 tours par minute pendant 3 minutes à 20°C. Le surnageant a été éliminé et la phase inférieure a été transférée dans 4 tubes de 15 mL. Ces tubes ont alors été centrifugés et la phase supérieure a été éliminée à nouveau. Le culot a alors été transféré dans 2 tubes de 15 mL puis une solution saturée en sucre (640 g de sucre dans 0.5 L d'eau distillée) a été ajoutée. Une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions pendant 2 minutes a permis aux œufs de se retrouver dans la phase supérieure. Les œufs ont ensuite été transférés, en les « pêchant » (technique appelée *fishing*), dans un tube de 15 mL rempli de PBS.

Lorsque tous les œufs ont été transférés (leur présence a été vérifiée au microscope), quatre lavages successifs ont été effectués afin d'éliminer la solution sucrée. Cela a consisté en quatre centrifugations à 2500 tours par minute pendant 2 minutes à 20°C, le surnageant a été retiré entre chaque centrifugation et a été remplacé à nouveau par du PBS afin de diminuer la concentration en solution sucrée. A la fin des centrifugations, 10 mL de PBS ont été ajoutés et les œufs présents dans le tube ont été comptés.

b) Préparation des extraits

Le contrôle négatif a été préparé avec 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans du PBS, soit 400 µL de DMSO dans 9,6 mL de PBS. Onze grammes de chaque extrait ont été dilués dans 50 µL de DMSO et 1,25 mL de PBS pour constituer une solution-mère à 8000 µg/mL. A partir de cette solution-mère, une gamme de concentrations à 4000, 2000, 1000 et 500 µg/mL a été réalisée en cascade par dilutions successives dans la même solution que le témoin négatif.

Quatre cents microlitres d'extraits de chaque concentration préparée (y compris la solution-mère) ont été déposés en quatre réplicats dans une plaque de 96 puits (Figure 22). Ensuite, 400 µL de la suspension d'œufs préalablement préparée ont été ajoutés à chaque puits de la plaque. Les concentrations finales sont ainsi de 4000, 2000, 1000, 500 et 250 µg/mL. Afin de protéger les œufs des variations de température, du PBS est ajouté en périphérie de la plaque. Enfin, la plaque a été recouverte avec du parafilm et celle-ci a été mise à l'étuve à 28°C pour une incubation de 48 heures.

Après ces 48 heures, une goutte de solution de Lugol (1 g d'iode, 2 g d'iodure de potassium et 50 mL d'eau distillée) a été ajoutée à chaque puits de la plaque pour stopper l'éclosion. Une goutte de chaque puits a ensuite été déposée sur une lame et observée au microscope, quatre fois pour chaque puits. Les œufs et les larves ont alors été comptés au microscope. La présence d'un faible nombre de larves indique qu'il y a une forte inhibition de l'éclosion des œufs et que l'extrait testé est actif. Le logiciel POLO PLUS® utilisé à l'école vétérinaire a permis de calculer des EC_{50}^* et IC_{95}^* . Une moyenne de la concentration efficace pour inhiber 50% de l'éclosion (EC_{50}) a ainsi été calculée par les quatre réplicats de chaque concentration ainsi qu'un intervalle de confiance IC_{95} . Le test du contrôle positif, thiabendazole, a été réalisé à plusieurs concentrations : 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL sur les deux souches : sensible (JUAN) et résistante (WR).



X : ajout de PBS pour prévenir les variations de température sur la plaque

● 1^{er} extrait testé 4 fois (colonne)
à 5 concentrations différentes (B à F)

● 2nd extrait testé 4 fois (colonne)
à 5 concentrations différentes (B à F)

● Témoin négatif : PBS + 4% DMSO

Figure 22 : Réalisation de la plaque pour le test EHA

1.3.2. Test de dégainement des larves (LEIA) [66][67]

Ce test *in vitro* a été utilisé afin d'observer l'effet anthelminthique d'un extrait de champignon sur le dégainement des larves au stade L3 dont la mue est incomplète. L'efficacité du champignon sera prouvée s'il inhibe de façon significative le dégainement des larves par rapport à un témoin. En effet, l'inhibition du dégainement chez la larve l'empêche d'acquérir son pouvoir infestant. Le test a consisté à mettre en contact les larves L3 avec des solutions de concentration croissante d'extrait de champignons. Le nombre de larves qui muent et sortent de leur gaine ont alors été comptés contre celles qui n'arrivent pas à se dégainer (Figure 23).

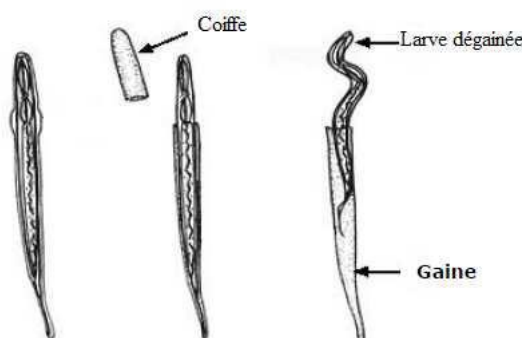


Figure 23 : *Haemonchus contortus* engainé (gauche) et dégainé (droite) [68]

a) Choix de l'étalon

Le dégainement artificiel des larves L3 a été induit par une solution contenant 2% d'hypochlorite de sodium et 16,5% de chlorure de sodium, appelée solution Milton®.

Avant de mettre en place le test, il a fallu au préalable déterminer la concentration en solution de Milton nécessaire pour provoquer le dégainement. Différentes dilutions ont été effectuées : 1/5, 1/4, 1/3 et au 1/2 pour donner des concentrations respectives en hypochlorite de sodium de 4 ‰, 5 ‰, 6,6 ‰ et 10 ‰. Un test de dégainement a ensuite été réalisé avec un volume égal (dilution au 1/2) de larves L3 à une concentration de 1000 larves/mL dans du PBS pour obtenir des concentrations finales respectives de 2‰, 2,5 ‰, 3,3 ‰ et 5 ‰. Puis, 40 µL de chaque solution ont été prélevés toutes les 20 minutes (t_0 , t_{20} , t_{40} , t_{60}), et étalés entre lame et lamelle puis fixés à la chaleur. Enfin, les larves engainées et dégainées ont été comptées. Cette expérience a été renouvelée 4 fois. La courbe obtenue pour chaque concentration en fonction du temps a permis de trouver la concentration de solution de Milton provoquant un dégainement optimal. En effet, la pente de la courbe de saturation ne doit être ni trop forte (sinon toutes les larves seraient dégainées), ni trop faible (sinon il n'y aurait pas assez de larves dégainées). La concentration de Milton, requise ici pour permettre un dégainement linéaire, progressif et total au bout de 60 minutes pour le témoin de référence, a été de 2,9 ‰ soit 0,3%.

b) Protocole du test de dégainement (mise en contact des extraits avec les larves)

Une solution mère d'extrait du champignon à tester à une concentration de 2400 µg/ml a été préparée dans du tampon phosphate salin (PBS). Un millilitre de suspension de larves L3 à 1000 larves/mL a été mis en contact avec 1 mL des différentes solutions d'extraits de champignons pour obtenir des concentrations finales dans les puits de 1200, 600, 300 et 150 µg/mL. Un contrôle négatif a été préparé avec uniquement du PBS et des larves. Les larves ont été laissées en contact avec les solutions d'extraits pendant 3 heures à 22°C et ont été agitées toutes les heures. À la fin de cette période, trois lavages successifs ont été effectués : cela a consisté en trois centrifugations à 2000 tours par minute à 20°C et 1 ml de surnageant a été remplacé par du PBS entre chaque lavage. Lors du dernier lavage, aucun ajout de PBS n'a été effectué.

c) Suivi de la cinétique de dégainement

Deux cents microlitres d'extrait à chacune des 4 concentrations ont été déposés dans un tube Eppendorf. A $T=0$, 40 µl de chacune de ces 4 solutions ont été déposés sur une lame afin d'observer le nombre de larves engainées et dégainées, ceci en quatre réplicats

par concentration. Cent soixante microlitres de solution Milton à 0,3% ont été ajoutés dans chaque Eppendorf puis 40 µl de chacune de ces 4 solutions ont été déposés sur une lame. Le nombre de larves a été compté à T=20, T=40 et T=60 minutes. Un contrôle positif d'épigallocatechine gallate (EGCG) a été réalisé à différentes concentrations : 37,5, 75, 150, 300 µg/mL [69]. Une moyenne de la concentration efficace pour inhiber 50% du dégainement (EC₅₀) a ainsi été calculée par les quatre réplicats de chaque concentration grâce au logiciel POLO PLUS®.

1.4. Analyses chimiques

1.4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM ont été réalisées sur des plaques de type TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Allemagne). Différentes phases mobiles ont été testées. Pour les extraits bruts cyclohexane et dichlorométhane, le système d'élution toluène/acétate d'éthyle 90:10 (v/v) a été retenu. Concernant les extraits bruts méthanoliques et aqueux, l'élution a été réalisée dans un mélange n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), appelé BAW, dont la phase organique (supérieure) seulement est utilisée. Après migration des composés, une observation des plaques sous une lampe UV a été réalisée : à 254 nm et à 366 nm avec une lampe CAMAG Reprostar 3 (CAMAG, Muttens, Switzerland). Une révélation chimique a ensuite été réalisée par pulvérisation de vanilline sulfurique. Les plaques ont été photographiées par un CAMAG ChromaCIM (CAMAG). Pour les fractions de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger* (PNM), la phase mobile a consisté en un mélange Chloroforme/Méthanol 90:10 (v/v) puis 80:20 (v/v) pour les fractions plus polaires obtenues par la suite. Pour certaines analyses CCM, le dépôt a été réalisé par un déposeur automatique de type CAMAG TLC Sampler 4 (ATS 4). Le logiciel utilisé est WinCATS® (CAMAG).

1.4.2. Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (CLUHP-BD)

L'appareil utilisé est LaChromUltra VWR (Hitachi, Tokyo, Japon) avec une pompe L-2160U et un injecteur L-2200U. La colonne a été maintenue à la température de 30°C par un four thermostaté L-2300. La détection a été réalisée par un détecteur à barrette de diode L-2455U. La séparation analytique des extraits méthanoliques a été réalisée sur une colonne C18 Kinetex (Phenomenex, Torrance, Etats-Unis) 2,6 µm 100A 100 x 4,6 mm.

Le débit a été de 1mL/min. Différents gradients utilisant de l'eau milliQ avec de l'acide formique et de l'acétonitrile HPLC grade (Fisher scientific, Loughborough, UK) ont été essayés. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/mL. Pour faire varier la résolution, différentes préparations d'échantillons, 100% MeOH ou H₂O/ACN : 50:50 (v/v) et différents volumes d'injection ont été testés (10, 20 et 30 µL).

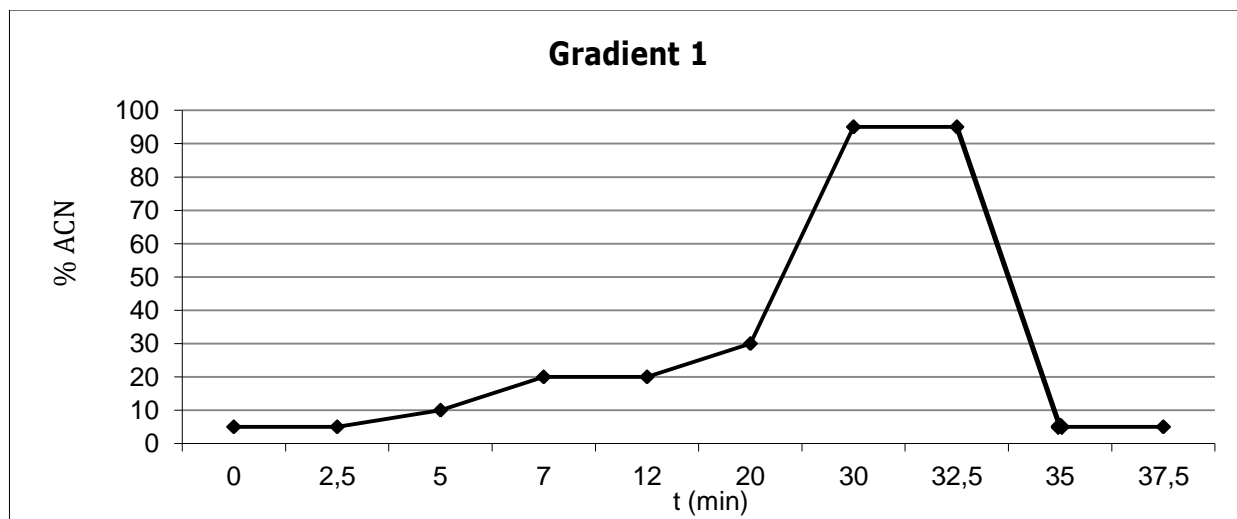


Figure 24 : Gradient ACN/eau HCOOH utilisé pour la séparation en CLUHP-BD avec la colonne C18 Kinetex

Les extraits méthanoliques de *Phellodon niger* et *Hydnellum ferrugineum* ont été analysés par le gradient 1 (Figure 24), utilisant de l'acétonitrile et de l'eau milliQ + acide formique 0,1%. Le gradient a débuté avec 5% d'ACN puis différentes pentes ont été élaborées afin d'optimiser la séparation des composés présents dans ces extraits méthanoliques.

Concernant les extraits aqueux, il n'a pas été possible d'obtenir une bonne séparation avec la colonne C18 Kinetex, malgré l'augmentation, en conditions initiales, du pourcentage d'H₂O + 0,1% HCOOH à 100%.

Une colonne HILIC Luna (Phenomenex, Torrance, Etats-Unis) 5 µm 150 x 4,6 mm a alors été utilisée avec un mélange ACN/eau 90:10 (v/v) en conditions initiales avec augmentation du pourcentage de la phase aqueuse au cours du temps, gradient 2 (Figure 25). Deux tampons différents ont aussi été utilisés : formiate d'ammonium à pH 3,2 et acétate d'ammonium à pH 5,2, utilisant aussi le gradient 2.

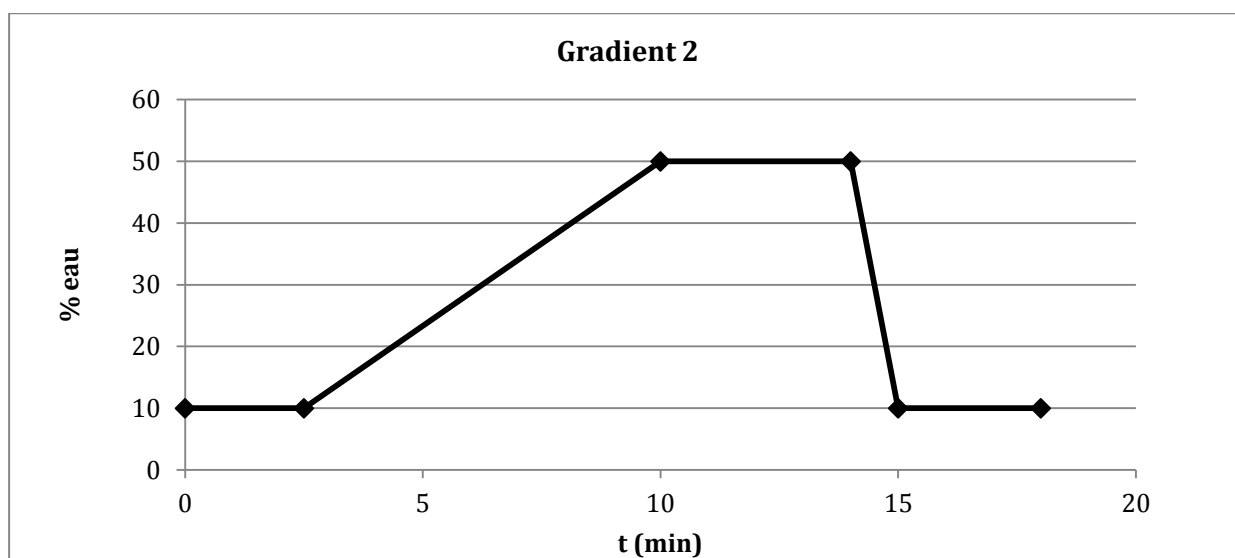


Figure 25 : Gradient ACN/eau utilisé pour la détection en CLUHP-BD avec la colonne HILIC Luna

1.4.3. Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem et à un détecteur de type Corona (CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona)

Les analyses ont été effectuées sur un appareil de chromatographie UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) avec une pompe Dionex Ultimate 3000 RS, un injecteur Dionex Ultimate 3000 RS et une barrette de diode Dionex UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific). Un détecteur d'aérosols chargés Dionex Corona Veo (Thermo Fisher Scientific) a permis de détecter tous les types d'analytes. Le spectromètre de masse LCQ Deca XP Max (Thermo Scientific Finnigan), source ESI avec un analyseur à trappe d'ion (TI) a permis d'obtenir des analyses en mode *full scan* et en mode *data dependent scan* (fragmentation de l'ion majoritaire à chaque scan). Les paramètres de masse sont présentés dans le Tableau 11. Un splitter (Analytical Scientific instruments) a permis de détecter simultanément les composés dans chaque détecteur : barrette de diode et corona. Le logiciel utilisé pour le traitement de données est Xcalibur 4.0™ (Thermo Scientific). Un gradient de 21 min utilisant de l'acétonitrile et de l'eau avec 0,1 % d'acide formique a été mis en place, gradient 3 (Figure 26). Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/mL dans H₂O/ACN 50:50 (v/v) pour HFM et 100% ACN pour PNM, puis filtrés sur des filtres en nylon de 0,45 µm ou sur des filtres pour Minisart® RC4 (Sartorius, Göttingen, Allemagne) avec une membrane de 0,45 µm. Un volume de 10 µL a été injecté à un débit de 0,4 ml/min.

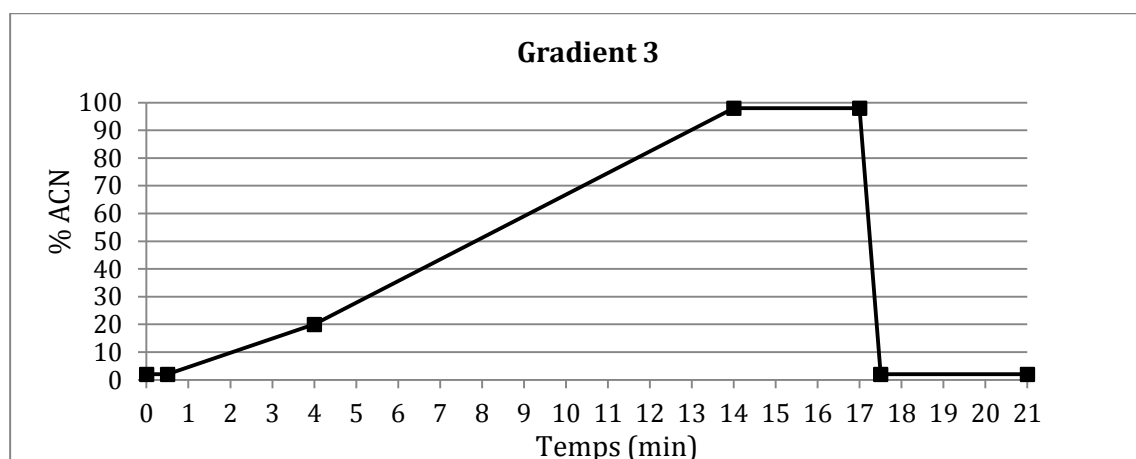


Figure 26 : Gradient ACN/eau HCOOH utilisé pour la détection en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona avec la colonne C18 Kinetex

Tableau 11 : Tableau des paramètres de masse de la source ESI sur le LCQ

Mode d'ionisation	Positif	Négatif
Masse range	m/z 50 à 2000	m/z 50 à 2000
Débit du gaz vecteur	70 ua	70 ua
Débit gaz auxiliaire	15 ua	15 ua
Voltage spray	5 kV	4,5 kV
T° capillaire	350°C	350°C
Voltage capillaire	15 Volts	- 15 Volts
Tube lens offset	50 Volts	- 45 Volts
Logiciel	XCalibur	XCalibur

1.4.4. Chromatographie liquide ultra performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution (CLUP®-ESI-QToF-SM^E)

Cette technique a permis d'obtenir la masse exacte des ions détectés. Les analyses ont été effectuées sur un appareil de chromatographie Acquity UPLC® (Waters, Milford, Etats-Unis). Une colonne Acquity Waters BEH C18 : 100 x 2,1 mm 1,7 µm a été utilisée avec le même gradient 3 mais utilisant de l'acide formique dans l'acétonitrile, soit H₂O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1 % HCOOH à un débit de 0,3 mL /min. La colonne a été maintenue à 35°C. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/mL dans un mélange eau/ACN 50:50 (v/v) pour HFM et 100% ACN pour PNM puis filtrés sur des filtres en nylon de 0,45 µm ou sur des filtres pour Minisart® RC4 (Sartorius) avec une membrane de 0,45 µm. Un volume de 2 µL a été injecté. Les paramètres de masse sont présentés dans le Tableau 12.

L'approche SM^E permet d'obtenir des informations de fragmentation dans l'étude en LC/MS de petites molécules présentes dans des mélanges complexes [70]. En réalisant des acquisitions simultanées de la masse exacte à haute et à basse énergie de collision, cette technique est capable d'élucider des informations sur la composition et la

fragmentation. Cette nouvelle technique utilise une approche dans laquelle des balayages sont acquis à basse énergie de collision dans la cellule de collision pour obtenir des informations d'ions précurseurs. En parallèle, une haute énergie de collision est alternée pour obtenir des informations telles qu'un *full scan* (balayage complet) avec les masses exactes des fragments, des ions précurseurs et des pertes de neutres (Figure 27).

Tableau 12 : Tableau des paramètres de masse de la source ESI sur QTOF

Mode d'ionisation	Positif	Négatif
Masse range	m/z 50 à 1200	m/z 50 à 1200
Débit Gaz de désolvatation	1100L/hr	1100L/hr
Débit Gaz Cône	20L/hr	20L/hr
Voltage Capillaire	3 kV	2,5 kV
Tube Lens offset	17 Volts	24 Volts
Température désolvatation	450°C	450°C
Energie de collision <i>Full scan</i>	6eV	6eV
Energie de collision SM^E	15 à 35 eV	15 à 35 eV
Logiciel	MassLynx 4.1	MassLynx 4.1

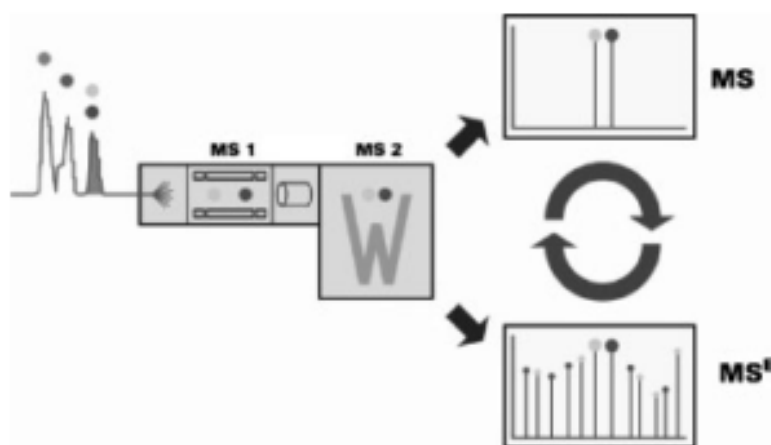


Figure 27 : Alternance de collecte de données de basse (MS^E) et de haute énergie de collision (MS) [70]

1.4.5. Chromatographie sur couche mince couplée à un spectromètre de masse (CCM-SM)

L'interface utilisée est de type CAMAG catégorie N°022.8401 et série N°181117. L'entrée de solvant se fait par la pompe CLHP LaChromUltra VWR (Hitachi) L-2160U à un débit de 0,1 à 0,3 mL/min. Le détecteur utilisé, spectromètre de masse à analyseur à trappe d'ion, est celui décrit précédemment dans les analyses par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. Un piston vient prélever la tache sélectionnée sur la CCM en utilisant le l'azote à une pression de 0,4 à 0,5 bar. Un courant de solvant vient désorber les molécules de la silice. Celles-ci sont ensuite détectées par spectrométrie de masse.

1.5. Fractionnement

Le fractionnement de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger* (PNM) a été réalisé sur une colonne ouverte de chromatographie. Un petit morceau de laine de verre a été préalablement déposé en bas de la colonne. La phase stationnaire a consisté en 50 g de silice Si 60 (40-63 μm) Merck, mis préalablement 1h à l'étuve à 70°C. La colonne a été conditionnée dans 100% de chloroforme. L'extrait étant peu soluble dans les conditions initiales d'élution, un dépôt sec a été réalisé (1 g d'extrait adsorbé sur de la silice 60 (40-63 μm) Merck). Ce dernier a été déposé délicatement sur la phase stationnaire et a été recouvert par du sable de Fontainebleau. La phase mobile a consisté en 200 mL de mélange de solvant de polarité croissante : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1, 97:3, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90, 0:100 (v/v). Des fractions de 50 mL ont été récupérées et le solvant a été évaporé au Rotavapor® afin d'obtenir les différentes fractions sèches. Celles-ci ont été pesées et analysées en CCM. Ces fractions ont été regroupées si leur profil chimique (mêmes révélations à un même R_f) était identique (Figure 28).



Figure 28 : Montage du fractionnement de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger*

2. Résultats et discussion

2.1. Extraction

Les extractions successives de chaque champignon (120 g) ont permis d'obtenir 4 extraits pour chaque champignon. Des abréviations leurs ont été attribuées pour simplifier les résultats (Tableau 13).

Tableau 13 : Abréviations données aux extraits des deux champignons

	<i>Hydnellum ferrugineum</i>	<i>Phellodon niger</i>
Cyclohexane	HFC	PNC
Dichlorométhane	HFD	PND
Méthanol	HFM	PNM
Eau	HFE	PNE

Un bilan massique a été calculé en fonction de la quantité pesée au départ avant l'extraction, soit 120 g de poudre pour chaque champignon. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14 ci-dessous. La masse des extraits apolaires, cyclohexane et dichlorométhane, relativement faible, a mis en évidence la présence de composés très apolaires en petite quantité dans chacun des deux champignons. Les masses des extraits polaires, méthanolique et aqueux, beaucoup plus importantes, a indiqué la présence de nombreux composés polaires en petites quantités ou peu de composés mais en grande quantité.

Tableau 14 : Rendements massiques obtenus pour chaque extrait

Extrait	Masse (g) (Rendement massique en % par rapport au 120g)	Rendement en % par rapport à la masse totale d'extrait obtenue	Extrait	Masse (g) (Rendement massique en % par rapport au 120g)	Rendement en % par rapport à la masse totale d'extrait obtenue
HFC	1,73 (1,4%)	9%	PNC	2,77 (2,3%)	12%
HFD	1,06 (0,9%)	6%	PND	0,92 (0,8%)	4%
HFM	8,62 (7,2%)	47%	PNM	15,01 (12,5%)	65%
HFE	7,03 (5,8%)	38%	PNE	4,42 (3,7%)	19%
Total	18,44 (15,3%)	100 %	Total	23,2 (19,3%)	100 %

2.2. Evaluation de l'activité biologique des extraits sur *Haemonchus contortus*

Les extraits obtenus précédemment par l'extraction au reflux ont chacun été testés sur le parasite *Haemonchus contortus*. La réalisation de deux tests différents afin de déterminer l'activité anthelminthique, d'une part sur une souche sensible (JUAN) et

d'autre part, sur une souche résistante (WR) aux benzimidazoles et aux avermectines ont été réalisés à l'école vétérinaire de Toulouse.

2.2.1. Test d'éclosion des œufs (EHA)

Le test d'éclosion des œufs permet de déterminer l'activité anthelminthique. La présence d'un faible nombre de larves indique qu'il y a une forte inhibition de l'éclosion des œufs due à l'extrait testé. Les résultats sont présentés (Tableau 16) pour la souche sensible (JUAN) et (Tableau 17) pour la souche résistante (WR). L'EC₅₀ est donc la moyenne des concentrations pour laquelle 50% d'inhibition de l'éclosion est induite. Les extraits ont été testés à 5 concentrations : 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL. Concernant le témoin positif, le thiabendazole, les résultats sont présentés dans le Tableau 15. Il a été testé aux concentrations suivantes : 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL.

Tableau 15 : Résultats du test EHA du témoin positif, le thiabendazole, sur la souche sensible (JUAN) et sur la souche résistante (WR)

Concentration (µg/mL)	% éclosion (JUAN)	% inhibition (JUAN)	% éclosion (WR)	% inhibition (WR)
10	0	100	13,9	86,1
5	0	100	7,5	92,5
2,5	0	100	11,2	88,8
1,25	0,1	99,9	5,5	94,5
0,6	0	100	8,5	91,5
0,3	0	100	12,3	87,7

Aucune valeur d'EC₅₀ n'a pu être déterminée car elle est inférieure à la plus faible concentration testée. Pour la souche sensible, 0 % d'éclosion signifie que le thiabendazole exerce totalement son activité d'inhibition sur l'éclosion des œufs en larves. Concernant la souche résistante, le thiabendazole n'exerce pas totalement son activité d'inhibition de l'éclosion puisque le pourcentage d'éclosion est supérieur à 0 %. Cependant, il est constaté que l'activité du thiabendazole sur les deux souches est non dose-dépendante dans la gamme de concentrations testées. Une variabilité des résultats est observée. Il serait nécessaire de répéter les tests plusieurs fois afin de calculer des écarts-types.

Tableau 16 : Résultats du test EHA sur la souche sensible (JUAN) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₅ (µg/mL) inférieur	IC ₉₅ (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	533,2	398,4	658,9
<i>P. niger</i>	méthanol	1942,2	1839,0	2046,6
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	Dichlorométhane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	809,9	744,8	874,7
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	2944,4	2376,8	3256
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	INACTIF*		
Témoin positif	thiabendazole	0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL***		

* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL

*** Aucune EC₅₀ n'a pu être déterminée pour le témoin car la valeur est inférieure à la plus faible concentration testée

D'après le Tableau 16, les extraits plutôt polaires, aqueux et méthanoliques, présentent une activité inhibitrice de l'éclosion des œufs sur la souche sensible. A l'inverse, les extraits plus apolaires, cyclohexane et dichlorométhane, n'ont pas présenté d'activité dans la gamme de concentrations testées.

L'extrait aqueux de *Phellodon niger* s'est révélé avoir une activité inhibitrice sur l'éclosion la plus importante, avec une valeur d'EC₅₀ de 533,2 µg/mL. Par comparaison avec le témoin positif, l'extrait PNE est donc moins actif que l'anthelminthique de synthèse, thiabendazole. Néanmoins, l'extrait testé est un extrait brut, c'est-à-dire un mélange complexe de molécules alors que le témoin est une molécule pure. Cependant, il est difficile de chiffrer cette différence d'activité puisqu'une variabilité des résultats est observée.

Il est donc nécessaire de poursuivre par un fractionnement afin de déterminer la substance responsable de l'activité.

Tableau 17 : Résultats du test EHA sur la souche résistante (WR) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₅ (µg/mL) inférieur	IC ₉₅ (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	408,2	353,2	464,3
<i>P. niger</i>	méthanol	760,7	733,5	787,9
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	dichlorométhane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	894,8	673,2	1146,5
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	ACTIF (entre 600 et 1200 µg/mL)**		
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	INACTIF*		
Témoin positif	thiabendazole	0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL***		

* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL

** Aucune valeur n'a pu être calculée par le logiciel POLO PLUS®

*** Aucune EC₅₀ n'a pu être déterminée pour le témoin car la valeur est inférieure à la plus faible concentration testée

D'après le Tableau 17, les extraits aqueux et méthanoliques des deux champignons présentent une activité inhibitrice sur l'éclosion des œufs de la souche résistante, aux concentrations testées. A l'inverse, les résultats ont montré que les extraits cyclohexane et dichlorométhane ne présentent pas d'activité inhibitrice dans la gamme de concentrations testées sur cette souche résistante. Aucune inhibition de l'éclosion n'a été observée, même à 4000 µg/mL, plus forte concentration testée.

L'extrait PNE se révèle avoir l'activité inhibitrice la plus importante des extraits testés sur la souche résistante avec une valeur d'EC₅₀ de 408,2 µg/mL. Néanmoins, l'extrait testé est un extrait brut, c'est-à-dire un mélange complexe de molécules alors que le témoin est une molécule pure. Cependant, il est difficile de chiffrer cette différence d'activité puisqu'une variabilité des résultats est observée.

Au vu des résultats du test sur l'éclosion des œufs, les extraits les plus intéressants à étudier sont d'abord, les extraits aqueux puis les extraits méthanoliques.

2.2.2. Test de dégainement des larves (LEIA)

Le second test réalisé a été un test de dégainement des larves au stade L3. Le nombre de larves qui muent et sortent de leur gaine a été compté par comparaison à celles qui n'arrivent pas à se dégainer. L'extrait présente donc une activité s'il inhibe le dégainement. Une gamme a été réalisée avec les concentrations suivantes : 150, 300, 600, 1200 µg/mL. Les résultats des extraits sont présentés pour le test sur la souche

sensible (Tableau 18) et pour le test sur la souche résistante aux benzimidazoles et aux avermectines (Tableau 19).

D'après le Tableau 18, les extraits dichlorométhane, cyclohexane et aqueux ne présentent pas d'activité inhibitrice du dégainement des larves de la souche sensible, aux concentrations testées. L'extrait PNM est le plus actif des extraits sur l'inhibition du dégainement, avec une valeur d'EC₅₀ de 480,4 µg/mL, soit 4 fois moins actif que le contrôle positif, l'épigallocatechine gallate (ECGC) (EC₅₀ de 108,6 µg/mL). Comme précédemment lors du test EHA, ceci peut s'expliquer par le fait que l'extrait testé est un mélange complexe de molécules alors que le témoin est une molécule pure. En revanche, le logiciel n'a pas pu calculer de valeur pour HFM sur la souche sensible.

Tableau 18 : Résultats du test LEIA sur souche sensible (JUAN) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₅ (µg/mL) inférieur	IC ₉₅ (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	méthanol	480,4	449,1	513,2
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	dichlorométhane	***		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	840,4	788,8	895,3
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	ACTIF (entre 600 et 1200 µg/mL)**		
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	***		
ECGC	contrôle positif	108,6	98,7	119,4

* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 150, 300, 600, 1200 µg/mL

** Aucune valeur précise n'a pu être calculée avec le logiciel POLO PLUS®

*** Non testé car extrait non soluble dans le DMSO

Tableau 19 : Résultats du test LEIA sur souche résistante (WR) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₅ (µg/mL) inférieur	IC ₉₅ (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	817,8	772,9	863,9
<i>P. niger</i>	méthanol	198,0	188,3	209,6
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	dichlorométhane	***		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	791,5	554,9	1343,3
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	328,8	276,7	386,6
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	***		
EGCG	contrôle positif	165,6	117,8	223,9

* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 150, 300, 600, 1200 µg/mL

*** Non testé car extrait non soluble dans le DMSO

D'après le Tableau 19, les extraits dichlorométhane et cyclohexane ne présentent pas d'activité inhibitrice du dégainement des larves de la souche résistante, aux concentrations testées. L'extrait PNM se révèle être l'extrait le plus actif sur l'inhibition du dégainement avec une valeur d' EC_{50} de 198,0 $\mu\text{g/mL}$, du même ordre de grandeur que l' EC_{50} du contrôle positif, ECGC (EC_{50} de 165,6 $\mu\text{g/mL}$). L'objectif d'utiliser ce témoin positif, épigallocatechine gallate riche en tanins, est de comparer l'activité des extraits de champignons aux tanins, préalablement étudiés à l'ENVT [69].

Au vu des résultats du test sur le dégainement des larves, les extraits les plus intéressants à étudier sont d'abord, les extraits méthanoliques des deux champignons puis leurs extraits aqueux.

2.2.3. Bilan sur l'activité des extraits

Ces deux tests montrent tous les deux l'activité anthelminthique des différents extraits sur une souche sensible et sur une souche résistante aux benzimidazoles et aux avermectines. Les extraits méthanoliques et aqueux de chacun des deux champignons se sont révélés être les extraits les plus actifs et ont été analysés en chimie pour en étudier la composition.

2.3. Analyses chimiques des extraits bruts des deux macromycètes

Après les résultats d'activité biologique, les extraits ont ensuite été analysés afin d'étudier la composition de l'extrait.

a) Chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans un but analytique, et afin de comparer les profils chimiques des différents extraits, ceux-ci ont été analysés en CCM. Les extraits ont été déposés sur des plaques CCM et ont été élués dans différents solvants afin d'observer la complexité de chaque extrait. Après élution, une observation des plaques sous une lampe UV a été réalisée : à 254 nm et à 366 nm. Une révélation a ensuite été accomplie par pulvérisation de vanilline sulfurique (Figure 29).

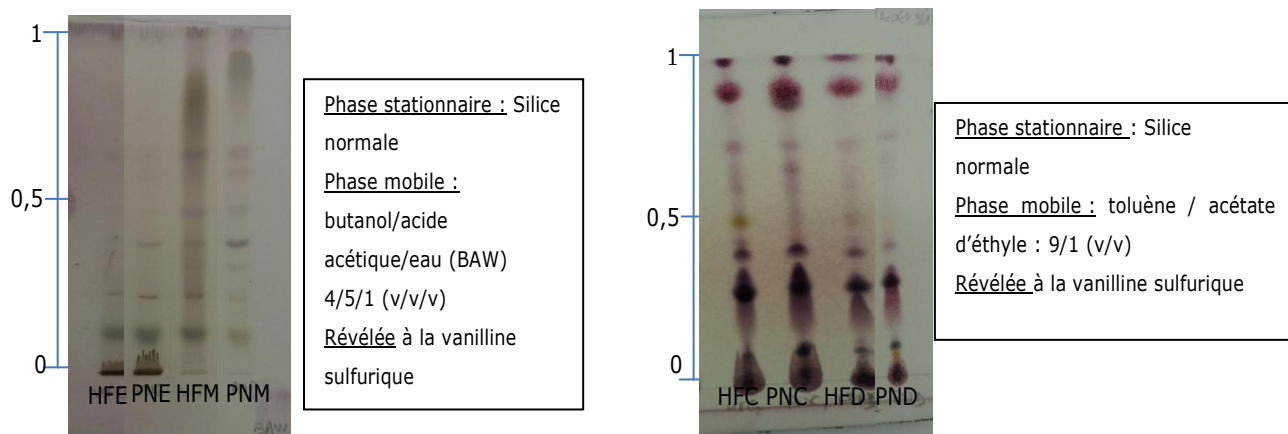


Figure 29: CCM des extraits polaires HFE, PNE et HFM, PNM (gauche) et CCM des extraits apolaires HFC, PNC et HFD, PND (droite)

Concernant les extraits aqueux, à gauche sur la Figure 29, les composés ont une très forte affinité pour la silice. Il a donc été difficile de faire éluer les composés dans le BAW avec des R_f communs entre les deux champignons : 0,11, 0,22 et une tache en plus pour PNE avec un rapport frontal (R_f) de 0,38. D'autres systèmes ont été essayés, tels que chloroforme / méthanol / eau 65:45:10 (v/v/v) ou chloroforme / méthanol / acide acétique / eau : 60:32:12:8 (v/v/v/v) dans le but de protonner tous les composés pour qu'ils restent moins adsorbés sur la silice. L'élution n'a pas été suffisante ($R_f < 0,3$) pour ces deux systèmes et des traces ont été observées au lieu de taches. Le BAW a cependant été le système d'élution le plus approprié pour séparer les composés des extraits méthanoliques. Plusieurs taches ayant des R_f identiques entre HFM et PNM ont été observées : 0,11, 0,22, 0,39, 0,46. Une tache à un R_f de 0,77 pour HFM et de 0,89 pour PNM a permis de les différencier.

Concernant les extraits plus apolaires (Figure 29 droite), le système d'élution choisi, toluène / acétate d'éthyle 9:1 (v/v), a permis d'éluer un grand nombre de composés dont certains ayant des R_f identiques pour les quatre extraits HFC, PNC, HFD et PND (R_f : 0,06, 0,26, 0,33, 0,38, 0,69, 0,87 et 1). Cependant, une tache jaune à la vanilline sulfurique (R_f : 0,47) a été retrouvée sur les deux extraits cyclohexane et dichlorométhane d'*Hydnellum ferrugineum* mais n'a pas été observée dans les mêmes extraits chez *Phellodon niger*. Une tache dans l'extrait PNC (R_f : 0,62) a aussi été détectée.

Les profils des deux champignons pour chaque type d'extrait ont des profils chromatographiques très similaires ; il semblerait alors que leur composition soit relativement proche. Afin d'approfondir cette étude chimique, des analyses en CLUP-UV-SM ont été réalisées.

b) Extraits aqueux des deux macromycètes

Concernant les extraits aqueux, il a été très difficile d'obtenir une bonne séparation. Les composés étant très polaires, ils ont peu d'interactions avec la phase stationnaire C18 apolaire. Après injection de 10 µL de l'extrait aqueux d'*Hydnellum ferrugineum* à 10 mg/mL, un pic a été mis en évidence sur le chromatogramme, à un temps de rétention très proche de celui du pic d'injection. Afin d'optimiser l'analyse, différents gradients ont été essayés, notamment en augmentant le pourcentage d'eau dans les conditions initiales, 100 % H₂O + 0,1 % HCOOH au lieu de 95% dans la méthode décrite (Figure 24). Cependant, aucun gradient ne s'est avéré concluant pour une bonne séparation des composés contenus dans chacun des deux extraits aqueux. La phase stationnaire C18 n'étant pas adaptée à l'étude de ces composés polaires, un changement de phase stationnaire a alors été envisagé. Différentes analyses ont alors été réalisées en utilisant une phase stationnaire de type HILIC, plus adéquate pour ce type de composés, et un gradient 2 ACN/H₂O (Figure 25) comme phase mobile. Malgré l'utilisation de tampons acétate d'ammonium et formiate d'ammonium, aucune séparation satisfaisante n'a pu être obtenue.

L'étape de mise au point n'a donc pas été concluante avec les deux extraits aqueux. Aucune des deux phases stationnaires n'a été adaptée pour la séparation de ces extraits.

Ainsi, au vu des résultats d'activité biologique intéressants, de la plus grande facilité d'analyse en chromatographie liquide, et de la quantité d'extrait obtenue, il a été choisi de réaliser une étude plus approfondie des extraits méthanoliques d'*Hydnellum ferrugineum* et de *Phellodon niger*.

c) Extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*

Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (CLUHP-BD)

L'utilisation de cette technique a permis de réaliser une étape de mise au point de la méthode de séparation et de faire une analyse préliminaire de la composition chimique

des différents extraits avant de les analyser en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona ou en CLUP®-ESI QToF-SM^E. Concernant les extraits méthanoliques pour les deux macro-mycètes, le gradient utilisé (ACN/H₂O + 0,1 % HCOOH), après optimisation, est celui représenté sur le gradient 1 (Figure 24). Avec la colonne C18 utilisée, le pourcentage d'ACN est augmenté au cours du temps afin d'éluer les composés moins polaires. La mise au point de la méthode a été réalisée par modification de la préparation de l'échantillon et du volume injecté afin d'obtenir une meilleure résolution. Un chromatogramme expliquant ces différentes modifications est présenté (Figure 30) pour HFM. Les conditions optimales retenues pour les analyses ultérieures de l'extrait HFM ont consisté en l'injection de 10 µL d'échantillon préparé dans un mélange H₂O/MeOH 50:50 (v/v) (chromatogramme rose).

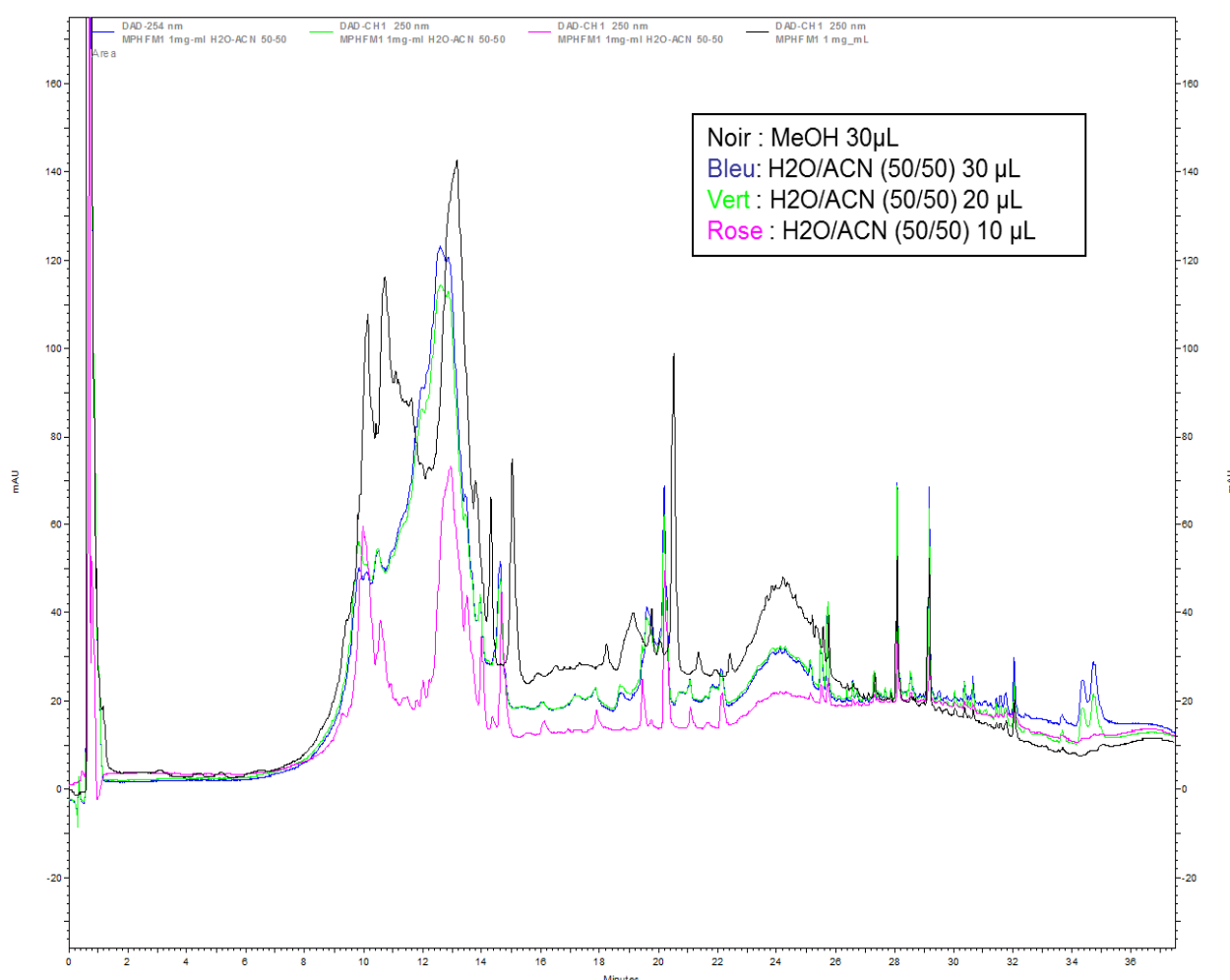


Figure 30 : Zoom de la comparaison de la préparation et du volume d'injection sur HFM en CLUHP-BD

L'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum* a révélé une composition assez complexe avec de nombreux pics observés dans le chromatogramme à 254 nm (chromatogramme rose en Figure 30). Les composés présents dans l'extrait semblent relativement difficiles à séparer, dans ce système, malgré l'étape d'optimisation préalable.

Afin d'avoir plus d'informations sur les composés présents dans l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*, des analyses en CLHP-SM/SM ont été réalisées.

Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem et à un détecteur de type corona (CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona)

La mise au point réalisée en CLUHP-BD avec le gradient 1 n'a pas été reproductible en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. Un nouveau gradient a donc été optimisé (Gradient 3 Figure 26).

En mode d'ionisation positive (Figure 31), l'extrait HFM a montré un profil relativement complexe notant la présence de nombreux pics mal résolus entre 5 et 7 min sur le total scan (a) et à 254 nm (c). Le Corona (b) indique aussi la présence de nombreux composés élués à des temps de rétention proche de ceux détectés sur le total scan (a) et d'autres pics élués plus tardivement qui ne seront pas analysés ici puisqu'ils ne sont pas visibles sur le total scan, et donc non observable dans les longueurs d'onde classiques (254 (c) et 366nm). Le chromatogramme CLUHP-ESI-TI-SM (d) a mis en évidence la présence de nombreux pics notamment entre 5 et 7 min dont les pics **1** et **2** à des temps de rétention respectivement de 6,3, 7,4 min. D'autres pics sont aussi présents sur le chromatogramme (d) dont les pics **3, 4, 5** et **6** à des temps de rétention respectifs de 10,3, 11, 11,8 et 12,6 min. Ces pics (**1** à **6**) ont été analysés plus en détails. Les spectres de masse de ces composés sont présentés ci-dessous (Figure 32 et Figure 34).

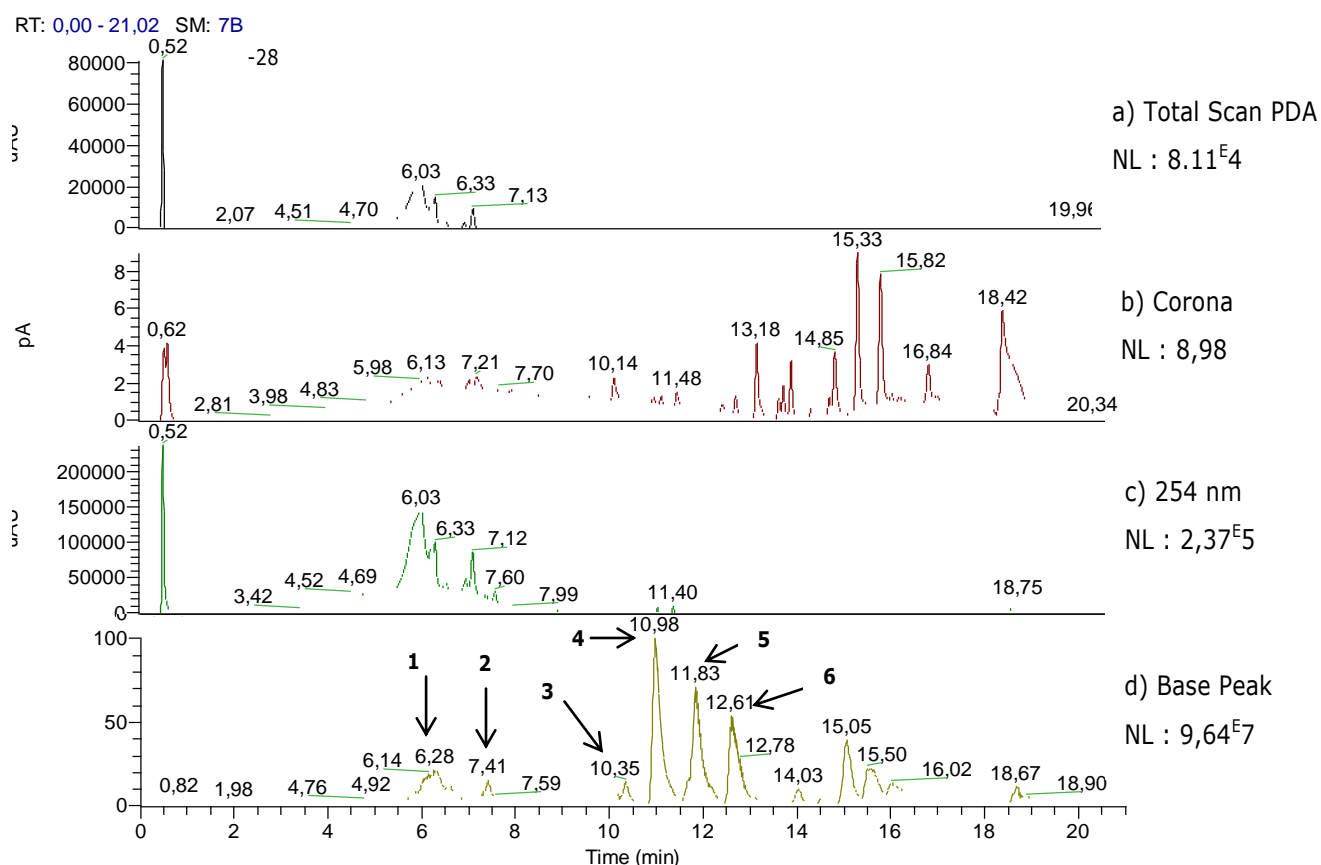


Figure 31 : Extrait de *H. ferrugineum* méthanolique en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d)

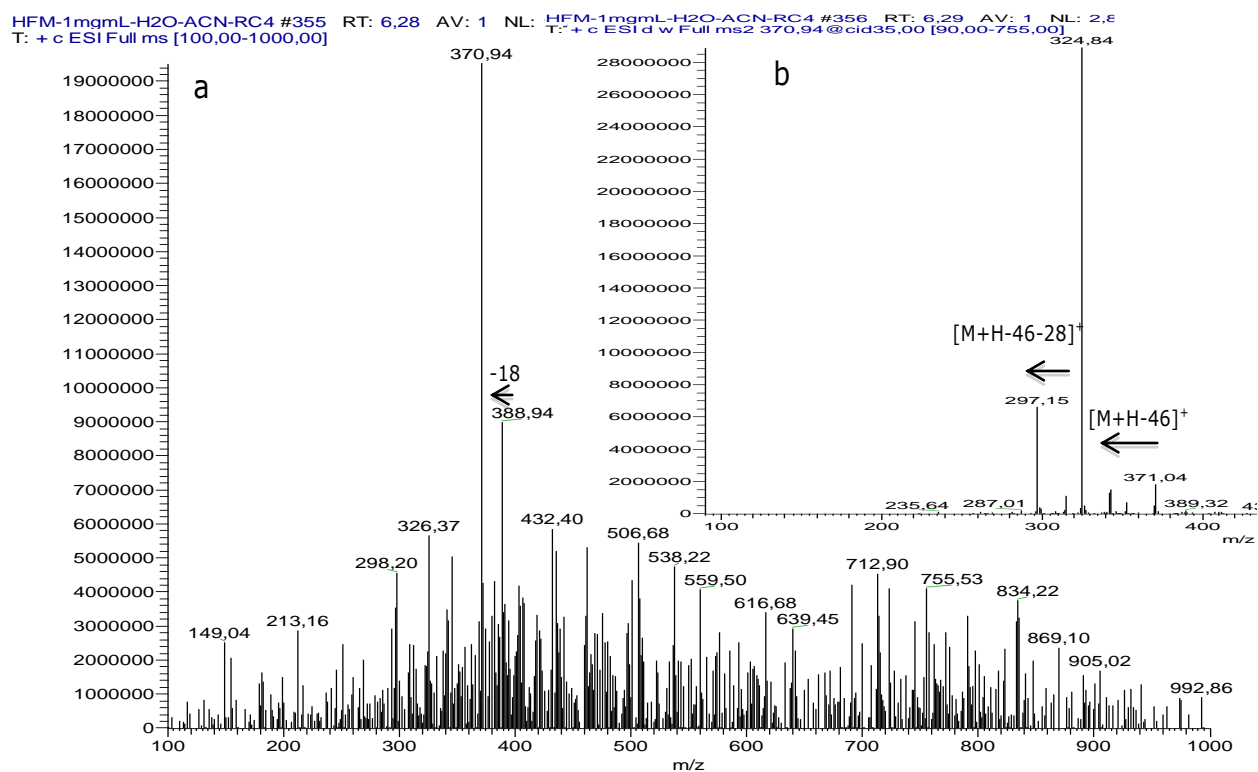


Figure 32 : Spectre de masse du pic 1 (TR : 6,3 min), en mode positif d'ionisation *full scan* (a) et spectre de fragmentation MS² obtenu en *data dependent scan* (b)

Le spectre obtenu pour le pic **1** met en évidence la présence d'un ion majoritaire de m/z 370,94 (Figure 32). Cet ion peut correspondre à l'adduit proton $[M+H]^+$ d'une molécule de MM 370 g/mol ou à l'adduit sodium $[M+Na]^+$ d'une molécule de MM 348 g/mol. Le spectre de fragmentation montre la présence de deux ions fragments de m/z 324,84 correspondant à $[M+H-46]^+$, probablement la perte d'un $[CO + H_2O]$ pouvant traduire la présence d'une fonction acide carboxylique dans la molécule, et de m/z 297,15 correspondant à $[M+H-46-28]^+$. La perte de 28u pourrait correspondre à la perte d'un groupement carbonyle ou N_2 ou C_2H_4 . L'analyse en mode négatif n'a pas permis de mettre en évidence l'adduit $[M-H]^-$ correspondant à ce même temps de rétention.

La Figure 32 a révélée également la présence d'un ion de m/z 388,94. Dans la littérature [62], Gripenberg a isolé deux pigments l'hydnuferrogine (**36**) (MM 370 g/mol) et l'hydnuferroginine (**37**) (MM 388 g/mol) (Figure 33). Il pourrait s'agir des deux molécules co-éluées puisque le chromatogramme est mal résolu entre 5 et 7 min. Un réarrangement à partir d'un précurseur commun tel qu'une terphénylquinone (**39**) en hydnuferrogine pourrait donner l'ion de m/z 370,94 majoritaire (Figure 33) [62]. La terphénylquinone pourrait être présente dans l'extrait puisqu'elle est décrite dans la littérature pour cette espèce [71]. La molécule (**39**) préalablement identifiée comme une terphénylquinone par Gripenberg en 1981 [62] est identifiée comme la variegatine par Liu en 2006 [71]. Il pourrait aussi s'agir de la molécule de MM 388 g/mol qui perd une molécule d'eau spontanément dans la source afin de donner l'ion de m/z 371.

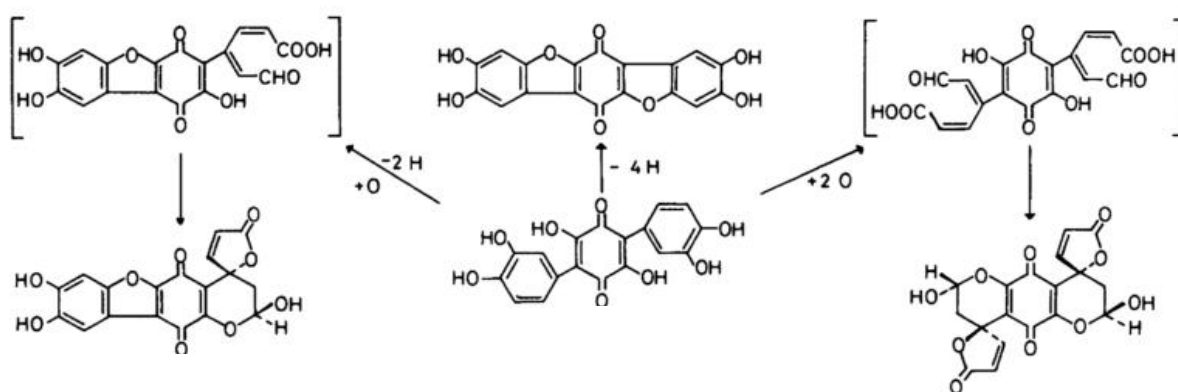


Figure 33 : Réarrangement à partir d'une terphénylquinone (**39**) en hydnuferroginine (**36**) ou en hydnuferrogine (**37**) ou en acide théléphorique (**38**) d'après Gripenberg en 1981 [62]

Après analyse des données de masse, il s'est avéré que les pics **3**, **4**, **5** et **6** (Figure 31) correspondent très probablement à des contaminants, car ils sont retrouvés dans toutes

les analyses réalisées. Une étude bibliographique nous a permis de supposer très fortement la présence de sels de benzylalkylmethylammonium dans nos extraits [72]. Ces pics sont détectés à des temps de rétention de 10,03 min avec un ion de m/z 304,26 pour **3**, à 10,62 min avec un ion de m/z 332,28 pour **4**, à 11,68 min avec un ion m/z de 360,29 pour **5** et à 12,51 min avec un ion de m/z 388,39 pour **6**. Il s'agirait de sels présents dans des désinfectants ou agents anti-corrosion.

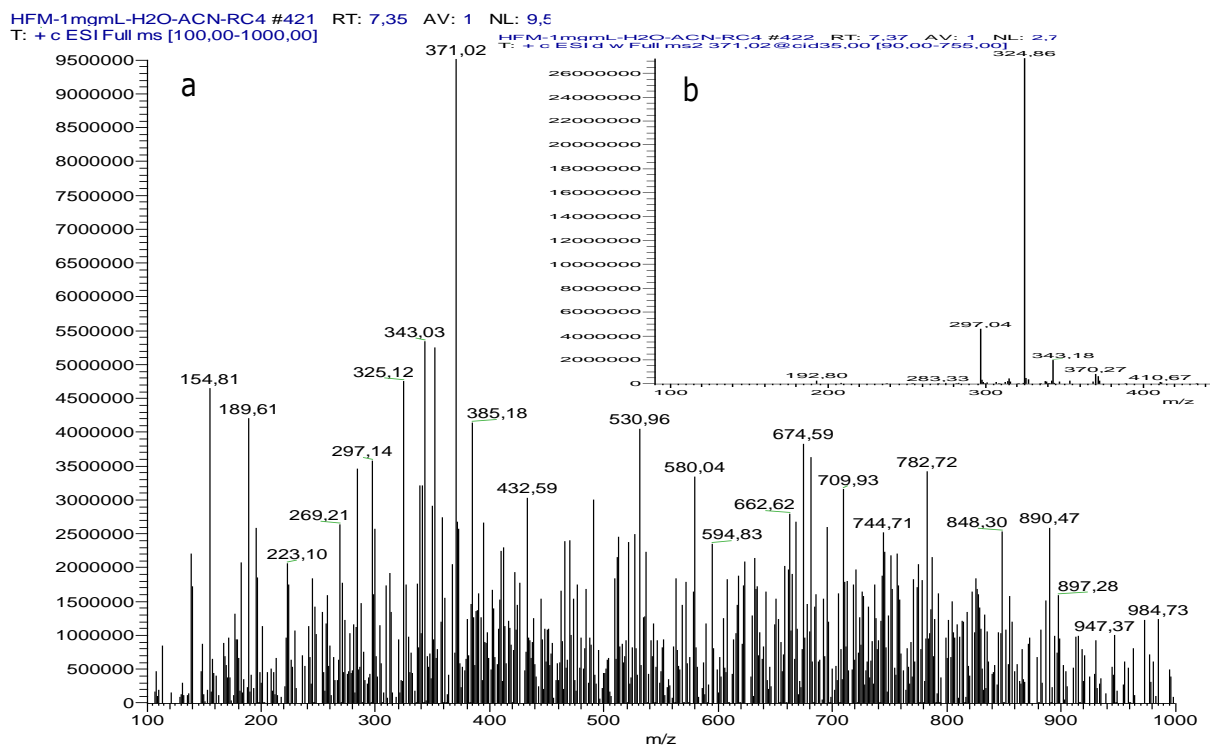


Figure 34 : Spectre de masse du pic **2** (TR : 7.40 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS² obtenu en « *data dependent scan* » (b)

D'après la Figure 34, le spectre met en évidence la présence d'un ion majoritaire de m/z 371,06. Cet ion peut correspondre à l'adduit proton $[M+H]^+$ d'une molécule de MM 370 g/mol ou à l'adduit sodium $[M+Na]^+$ d'une molécule de MM 348 g/mol. Le spectre de fragmentation montre la présence de deux ions fragments de m/z 324,86 correspondant à $[M+H-46]^+$, probablement la perte de 28u et d'eau, et m/z 297,04 correspondant à $[M+H-46-28]^+$. La perte de 28u pourrait correspondre à la perte de CO ou N₂ ou C₂H₄. Il est probable que la perte de 28u soit plutôt corrélée à la perte d'un groupement carbonyle dans ce cas puisque les composés identifiés dans la littérature pour cette espèce présentent des groupements carbonyles. Cette hypothèse mérite d'être confirmée en spectrométrie de masse haute résolution. Les fragments obtenus sont les mêmes que ceux présents pour le pic **1**, ce qui peut laisser supposer des molécules de même famille.

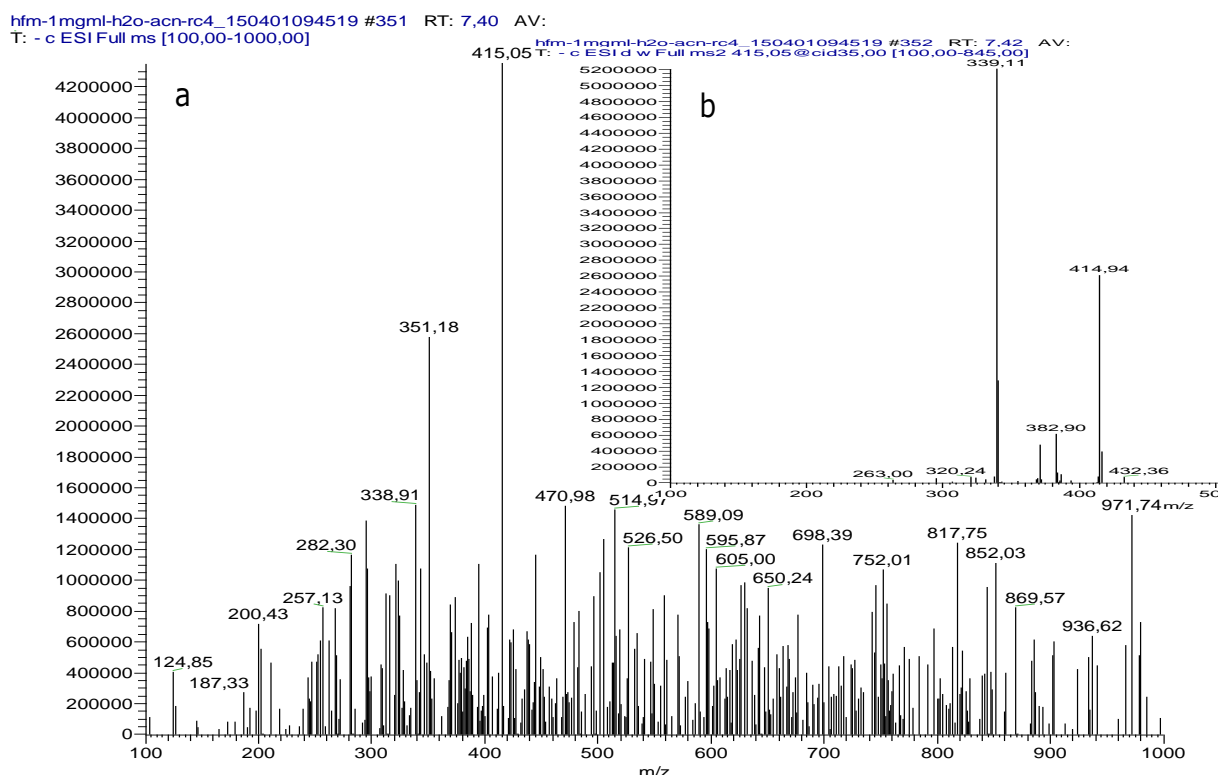


Figure 35 : Spectre de masse du pic 2 de HFM (TR : 7,40 min), en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS² obtenu en mode *data dependent scan* (b)

Le spectre en mode d'ionisation négative révèle la présence d'un ion de m/z 415,01 correspondant à $[M+HCOOH-H]^-$ (Figure 35). Il pourrait aussi s'agir de la molécule supposée précédemment, ayant pour MM 370 g/mol, l'hydnuferugine.

Conclusion sur l'analyse de l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*

L'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum* a révélé une composition assez complexe en CLUHP-BD avec de nombreux pics observés dans le chromatogramme à 254 nm (chromatogramme rose Figure 30) avec le gradient 1.

Dans l'analyse de l'extrait HFM, deux pics ont été annotés précédemment, **1** avec deux ions majoritaires de m/z 370,94 et m/z 388,94 et **2** avec un ion de m/z 371,06.

Dans la littérature [62], Gripenberg a isolé deux pigments l'hydnuferugine (**36**) (MM 370 g/mol) et l'hydnuferuginine (**37**) (MM 388 g/mol). D'après les log P déterminés pour les structures isolées de la littérature, log P = -2,6 pour l'hydnuferugine (MM 370 g/mol) et log P = -4,9 pour l'hydnuferuginine (MM 388 g/mol), on pourrait supposer que l'hydnuferuginine serait plus polaire et donc moins retenue sur la colonne et aurait un temps de rétention inférieur à l'hydnuferugine. Le pic **1** pourrait être l'hydnuferuginine et le pic **2** pourrait être l'hydnuferugine. Cependant, pour le pic **1**, il peut aussi s'agir de plusieurs molécules co-éluées au vu de l'allure du pic sur le chromatogramme (d) (Figure

31). Une optimisation du gradient afin de mieux séparer ces deux molécules co-élues lors de l'analyse CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona pourrait être envisagée.

Des réarrangements chimiques au sein de la source d'ionisation pourraient être supposés. L'un des plus probables serait alors la perte d'une molécule d'eau dans la source de l'ion m/z 388,9 pour donner l'ion m/z 370,9. Le pic **1** pourrait correspondre à une molécule de MM 388 g/mol telle que l'hydnuferugine, hypothèse corrélée avec les log P.

Une analyse complémentaire en CLUP-ESI-QTOF-SM^E pourrait confirmer l'hypothèse d'une formule brute $C_{18}H_{12}O_{10}$ correspondant à l'hydnuferugine et $C_{18}H_{10}O_9$ correspondant à l'hydnuferugine. Cette analyse a été réalisée, cependant la présence de contaminants majoritaires empêche de voir les composés réellement présents dans l'extrait. Ces contaminants ont été identifiés comme étant du nylon, composé présent dans les filtres utilisés pour la préparation de l'échantillon. Ces résultats ne sont donc pas présentés ici puisqu'ils ne sont pas interprétables. Cet appareil étant sur un plateau technique commun à l'université ; la réalisation de ces analyses est limitée.

Afin de compléter ces hypothèses, un fractionnement pourrait être réalisé afin de parvenir à une fraction pure pour l'analyser en RMN afin d'obtenir la structure de ces molécules correspondant aux pics **1** et **2** (Figure 31).

d) Extrait méthanolique de *Phellodon niger*

Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (CLUHP-BD)

De la même manière que pour l'analyse en CLUHP-BD pour l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*, le gradient utilisé (ACN/H₂O + 0,1% HCOOH), après optimisation, est celui représenté sur le gradient 1 (Figure 24). La mise au point de la méthode a été réalisée par modification de la préparation de l'échantillon et du volume injecté afin d'obtenir une meilleure résolution.

Un chromatogramme expliquant ces différentes modifications est présenté (Figure 36) pour PNM. La meilleure résolution a été obtenue en injectant 30 µL d'extrait solubilisé dans 100 % MeOH (en rose sur le chromatogramme).

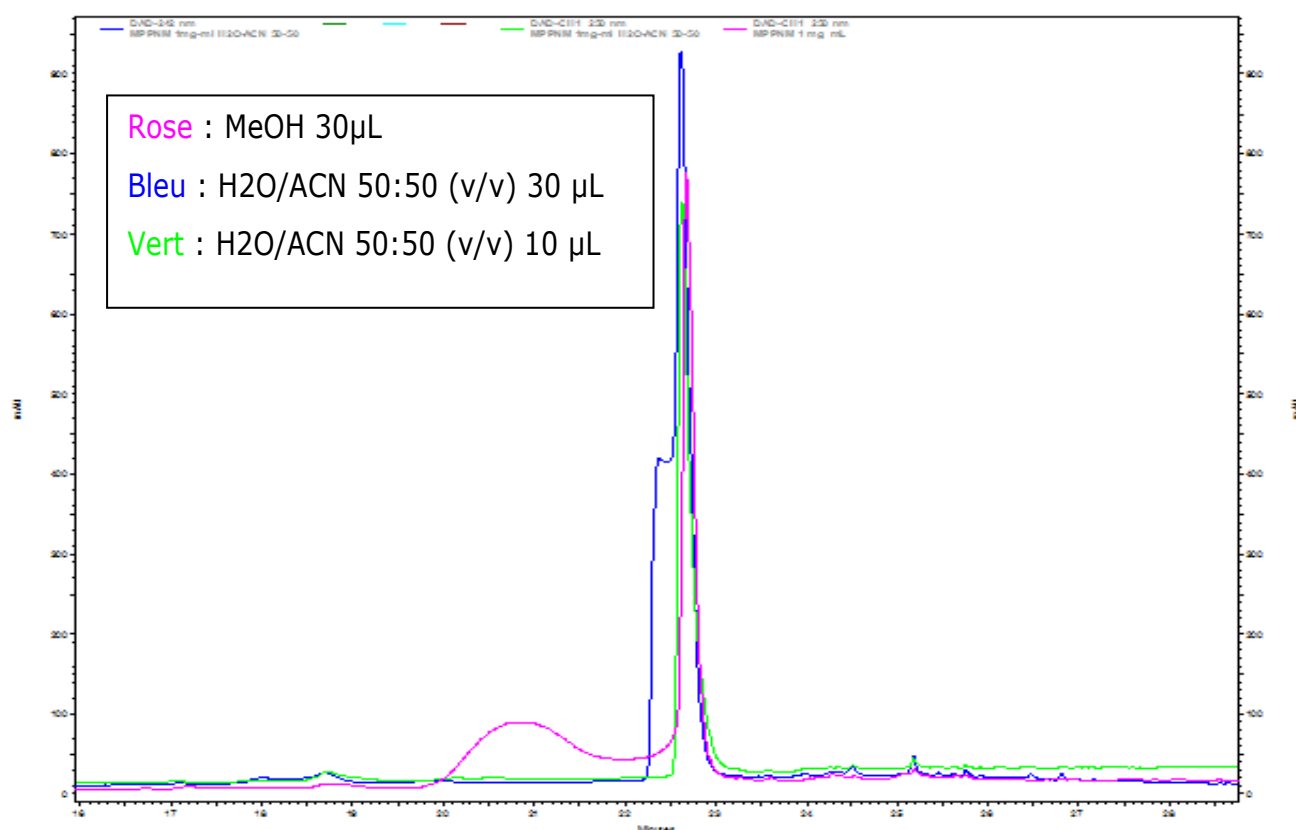


Figure 36 : Comparaison de la préparation et du volume d'injection de l'extrait PNM en CLUHP-BD

L'extrait méthanolique de *Phellodon niger* a présenté un profil chromatographique plus simple que celui d'*Hydnellum ferrugineum* (chromatogramme rose). La présence d'un pic majoritaire à 254 nm a pu être détectée à un temps de rétention de 22,7 min. Le spectre UV-visible correspondant présente cinq maxima d'absorption : $\lambda_{\max} = 224_{\text{sh}^*}, 246, 278, 330, 344\text{nm}$.

Afin d'avoir plus d'informations sur les composés présents dans l'extrait méthanolique de *Phellodon niger*, des analyses en CLHP-SM/SM ont été réalisées.

Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem et à un détecteur de type corona (CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona)

De la même manière que pour l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*, le gradient utilisé pour cette analyse est le gradient 3 (Figure 26).

La barrette de diode permet, en mode d'ionisation positive, de révéler la présence de deux pics majoritaires, correspondant à des molécules éluées à des temps de rétention 6,9 et 7,5 min sur le total scan donné (a) (Figure 37). La technologie de détection d'aérosols chargés, Corona, génère un signal directement proportionnel à la quantité d'analytes. Elle nous a permis ici de confirmer la présence des pics (**1** et **2**) d'un point de

vue quantitatif (b) (Figure 37). Le chromatogramme CLUHP-ESI-TI-SM (d) (Figure 37) a également mis en évidence la présence de deux pics majoritaires à des temps de rétention relativement proches (TR : 7,1 et 7,72) de ceux détectés sur la barrette de diode (décalage dû au montage des détecteurs en série). Les spectres de masse de ces composés sont présentés (Figure 38 et Figure 41).

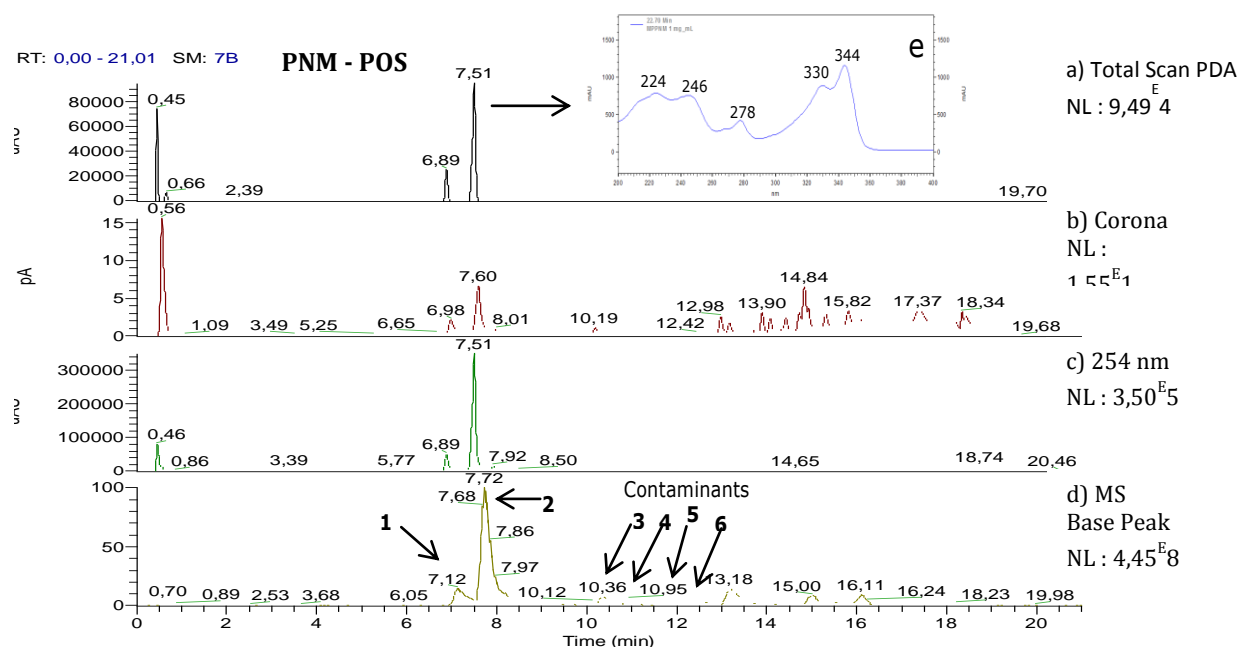


Figure 37 : Chromatogrammes de l'extract méthanolique de *P.niger* obtenus par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d) et spectre UV du pic à 7,51 min (e)

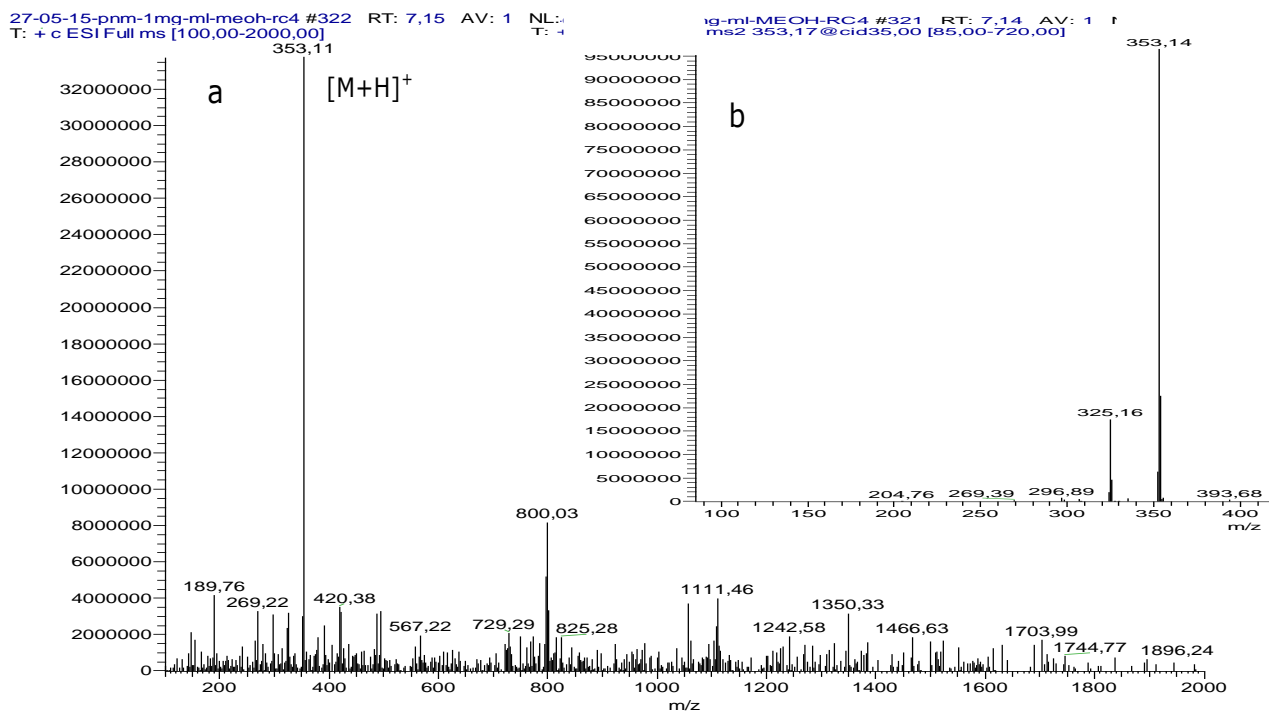


Figure 38 : Spectre de masse du pic 1 (TR : 7,2 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS² obtenu en mode « data dependent scan » (b)

Le spectre obtenu pour le pic **1** met en évidence la présence d'un ion majoritaire de m/z 353,11 (Figure 38). Cet ion peut correspondre à l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ d'une molécule de MM 352 g/mol ou à l'adduit sodium $[M+Na]^+$ d'une molécule de MM 330 g/mol. L'ion-fragment obtenu en mode *data dependent scan* indique une perte de 28u pouvant correspondre à la perte d'un groupement CO, N₂ ou C₂H₄. Le spectre UV-visible correspondant présente trois maxima d'absorption : $\lambda_{\max} = 237, 274, 325$.

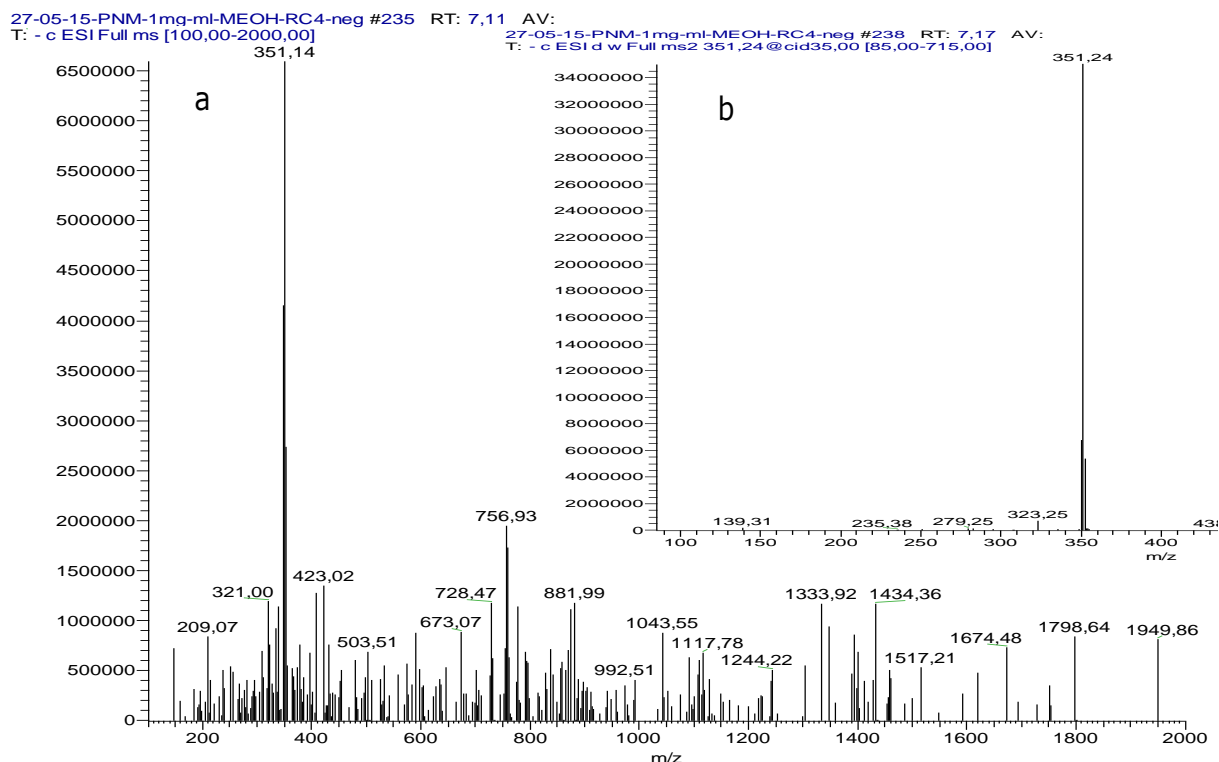
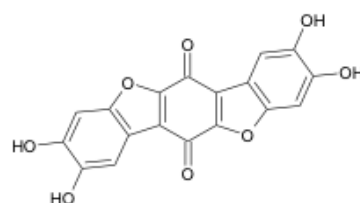


Figure 39 : Spectre de masse du pic **1** de PNM (TR : 7,1 min), en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS² obtenu en mode *data dependent scan* (b)

L'analyse en mode négatif (Figure 39) a mis en évidence, à ce même temps de rétention (TR : 7,1 min) un ion majoritaire de m/z 351 pouvant correspondre à la forme déprotonnée $[M-H]^-$ d'une molécule de MM 352 g/mol. En corrélant les analyses en mode négatif et positif d'ionisation, la présence d'une molécule de MM 352 g/mol dans l'extrait pourrait être fortement supposée. D'après les données de la littérature, un composé de MM 352 a déjà été décrit chez *Phellodon niger* : il s'agit de l'acide théléphorique (**38**) (Figure 40), qui pourrait donc correspondre au pic **1** [71]. Afin d'étayer cette hypothèse, une analyse en spectrométrie de masse haute résolution est indispensable pour accéder à la formule brute la plus probable pour cette molécule.



38

$C_{18}H_{18}O_8$

MM 352,25g/mol

Figure 40 : Structure de l'acide théléphorique (**38**)

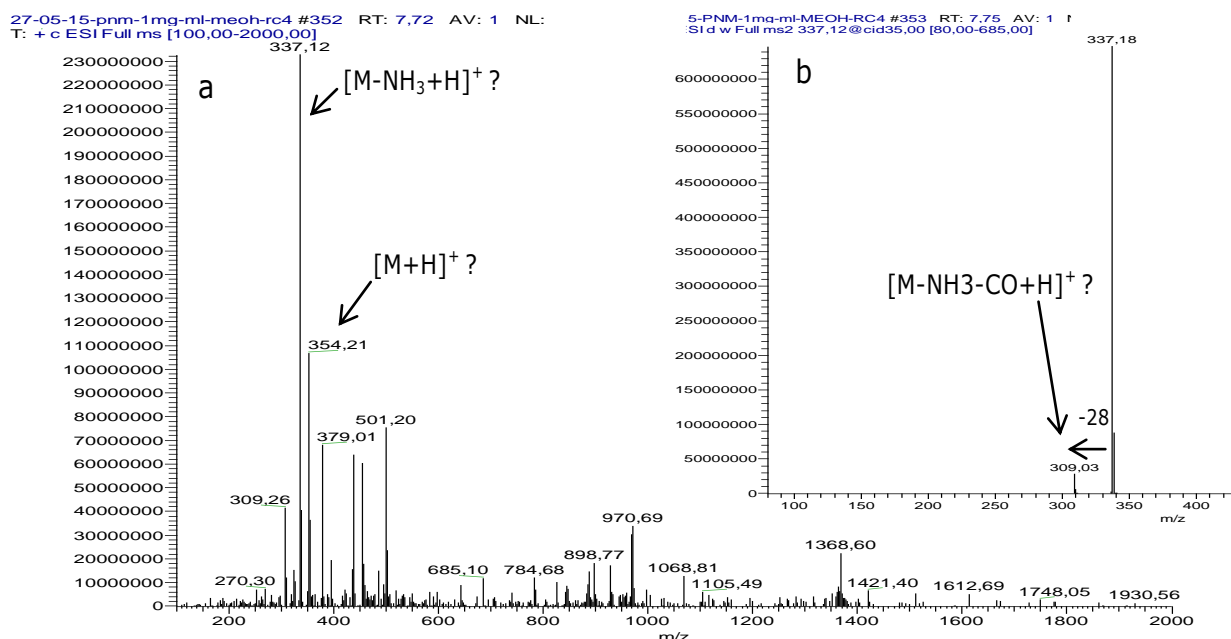


Figure 41 : Spectre de masse du pic **2** (TR : 7,72 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS^2 obtenu en « *data dependent scan* » (b)

Le spectre obtenu (Figure 37), pour le pic **2**, met en évidence la présence d'un ion de m/z 354,21 (Figure 41). Cet ion peut correspondre à l'adduit proton $[M+H]^+$ d'une molécule de MM 353 g/mol ou à l'adduit sodium $[M+Na]^+$ d'une molécule de MM 331 g/mol. Un ion majoritaire de m/z 337,12 identifié en *full scan* pourrait correspondre à la forme ionique $[M-NH_3+H]^+$. L'ion-fragment obtenu de m/z 309,05 à partir de l'ion de m/z 337,18 en mode *data dependent scan* indique une perte de 28u pouvant correspondre à la perte d'un groupement CO ou N_2 ou C_2H_4 . Le spectre UV-visible correspondant présente cinq maxima d'absorption : $\lambda_{max} = 224_{sh}, 246, 278, 330, 344nm$ (e Figure 37).

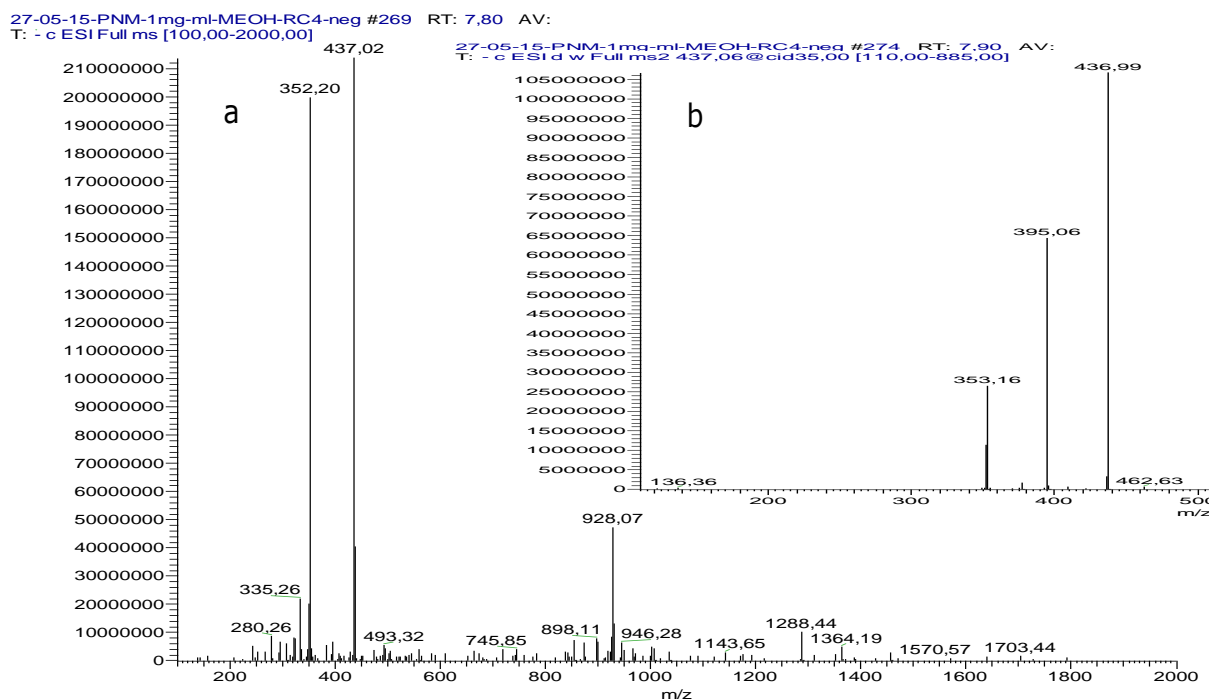


Figure 42 : Spectre de masse du pic **2** de PNM (TR : 7,80 min), en *full scan* en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS^2 obtenu en mode *data dependent scan* (b)

L'analyse en mode négatif (Figure 42) a mis en évidence un ion majoritaire de m/z 352,2 à ce même temps de rétention (TR : 7,80). Ceci confirmerait la présence d'une molécule de MM 353 g/mol dans l'extrait. Au vu de sa masse impaire, il s'agit d'une molécule azotée avec un nombre impair d'azote. D'après la consultation de SciFinder, aucun composé ayant cette masse n'a été identifié dans le règne des Fungi. Afin de confirmer la masse de cette molécule, une analyse en spectrométrie de masse haute résolution est indispensable pour accéder à sa formule brute la plus probable.

Les pics **3**, **4**, **5** et **6**, retrouvés préalablement dans HFM (Figure 31), en ionisation positive (Figure 37) correspondent très probablement à des contaminants. Il s'agirait donc de sels de benzylalkylmethyllummonium [71].

Chromatographie liquide ultra performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution (CLUP®-ESI-QToF-SM^E)

Afin d'étayer ces hypothèses, une analyse en spectrométrie de masse haute résolution est nécessaire pour accéder à la formule brute la plus probable.

Lors d'une première analyse de l'extrait PNM filtré sur des filtres en nylon 0,45 μm , des ions récurrents et présents dans le blanc ont été identifiés comme étant le nylon de formule brute $[C_{12}H_{22}N_2O_2]_n$ donnant un ion de m/z 227,176 correspondant à $[M+H]^+$ avec $n=1$, m/z 453,343 correspondant à $[M+H]^+$ avec $n=2$ et m/z 679,511 correspondant à

$[M+H]^+$ avec $n=3$. Il s'agit de la contamination d'un des lots de ces filtres en nylon utilisés usuellement au laboratoire. Les prochaines analyses dont les résultats sont présentés ci-dessous ont été réalisées en utilisant des filtres pour seringues Minisart® RC4 avec une membrane de 0,45 μm .

L'extrait brut PNM a donc été analysé en CLUP-ESI-QToF en utilisant les filtres Minisart® RC4 dont le chromatogramme est présenté ci-dessous (Figure 43).

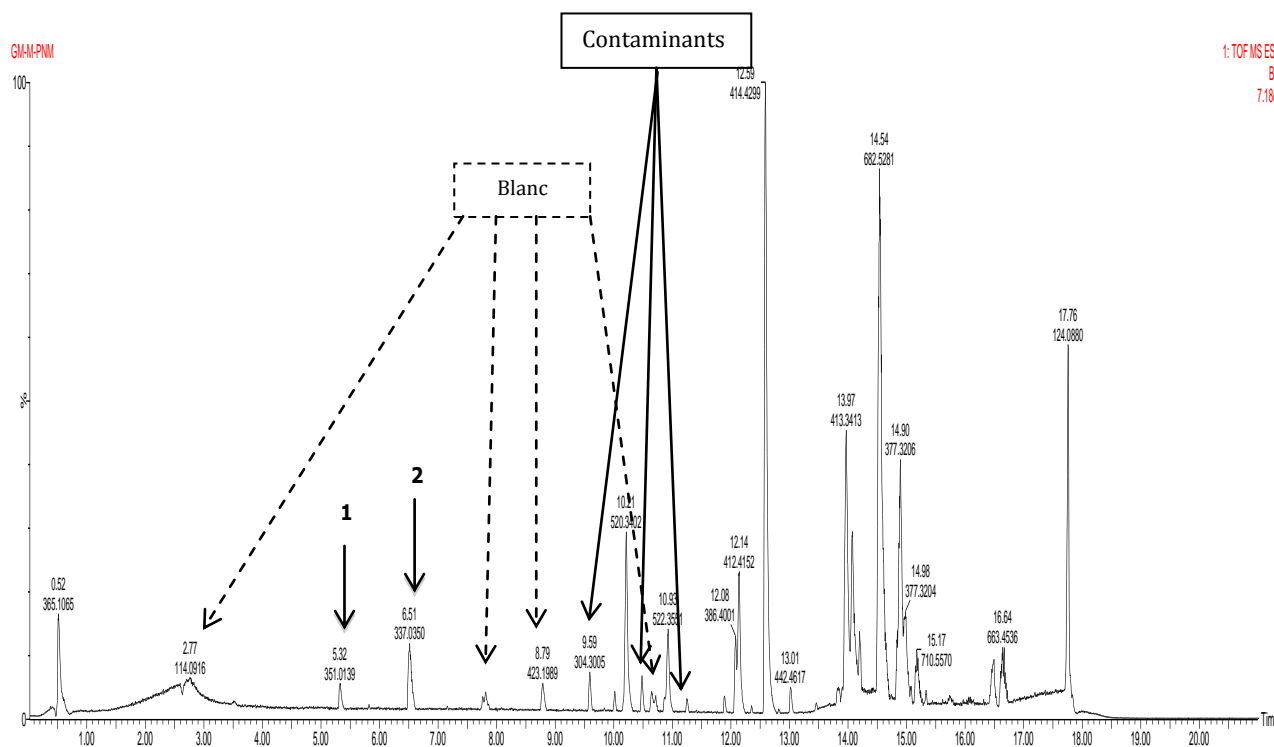


Figure 43 : Chromatogramme LCMS de l'extrait PNM analysé en CLUP®-ESI-QTOF-SM^E (mode positif d'ionisation)

En CLUP couplée à un détecteur de masse haute résolution en mode positif d'ionisation, l'extrait PNM a montré la présence de nombreux pics. Après soustraction des pics présents dans le blanc et de ceux des contaminants, deux pics majoritaires **1** et **2** (Figure 43) correspondant à des molécules éluées à des temps de rétention 5,33 et 6,51 min, ont été analysés plus particulièrement. Les spectres de masse de ces composés sont présentés (Figure 44) et (Figure 45).

Trois pics, identifiés comme contaminants (Figure 43), ont été retrouvés préalablement dans HFM (Figure 31) et dans PNM (Figure 37) lors des analyses en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. Ils correspondent très probablement à sels de benzylalkylmethylammonium [71].

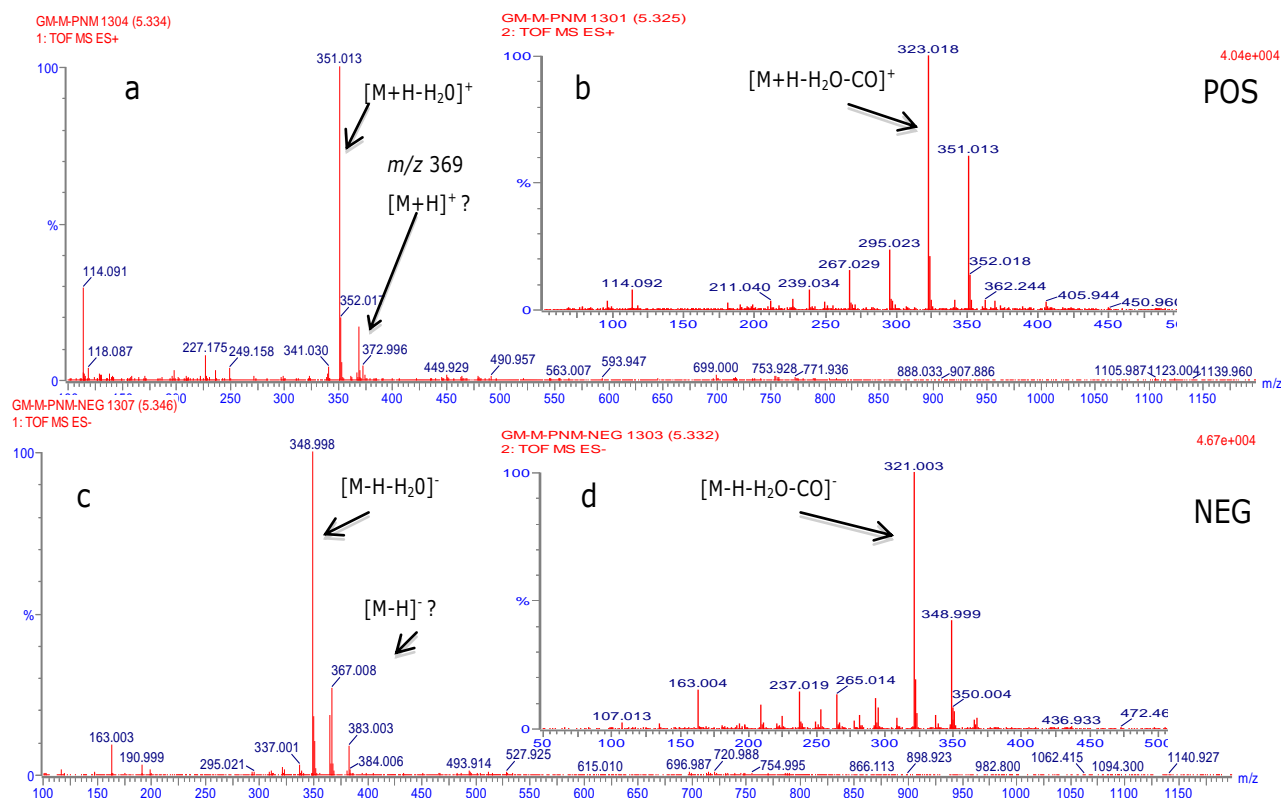


Figure 44 : Spectres de masses du pic **1** (TR : 5,32 min) de PNM en CLUP-QTOF en POS (a) et en NEG (b) et spectres de fragmentation SM^E (c et d)

D'après la Figure 44, pour le produit du pic **1**, la présence d'un ion majoritaire de m/z 351,013 est observée (a). Cependant, un ion de m/z 369,024 est aussi détecté correspondant à l'adduit proton $[M+H]^+$ d'une molécule de MM 368 g/mol. Cette molécule se fragmente dans la source pour donner l'ion de m/z 351,013 correspondant ainsi à la forme ionique $[M+H-H_2O]^+$. L'ion de m/z 323,016 (b), pourrait provenir de la fragmentation à partir de l'ion de m/z 351,013 (a), indiquant une perte de 28u. Cette différence peut correspondre à une perte de CO, N_2 ou C_2H_4 [73]. En analysant les formules brutes les plus probables pour la molécule et pour celle du fragment correspondant, on peut conclure sur la perte de CO.

En mode d'ionisation négative (c), un ion de m/z 367,008 est retrouvé et pourrait correspondre à $[M-H]^-$. Une perte de neutre d'une molécule d'eau est aussi observée par la présence de l'ion m/z 348,996 correspondant à la forme ionique $[M-H-H_2O]^-$. L'ion-fragment observé de m/z 321,003 (d) indique aussi une perte de 28u correspondant à la forme ionique $[M-H-H_2O-CO]^-$.

Les données de masse entre le mode positif et négatif corréleront pour conclure sur une molécule de masse moléculaire 368 g/mol. D'après le logiciel utilisé pour la lecture de la spectrométrie de masse haute résolution, la formule la plus probable pour cette molécule

est $C_{18}H_8O_9$. D'après la littérature *via* SciFinder, aucune molécule d'origine naturelle n'a été identifiée dans la littérature pour cette formule brute.

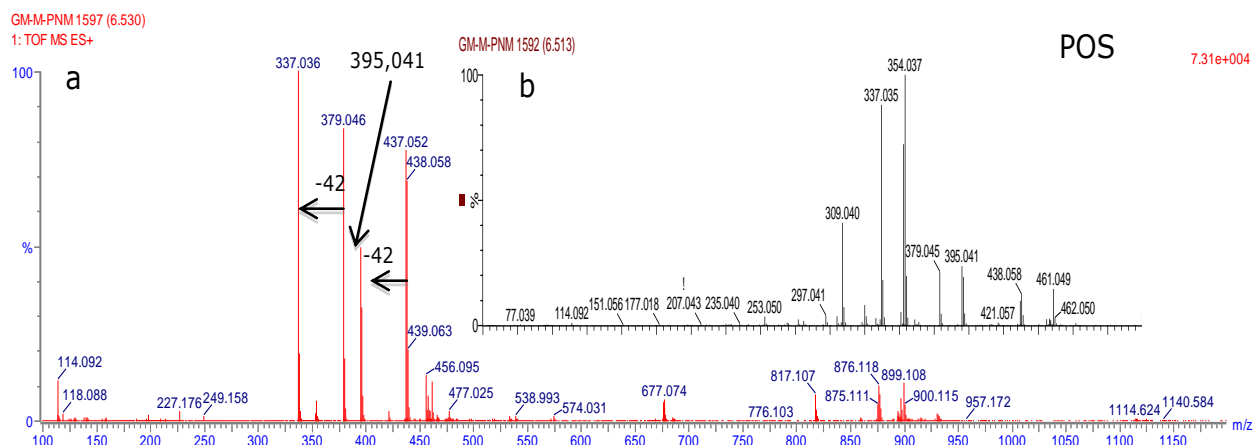


Figure 45 : Spectre de masse du pic 2 (TR : 6,53 min) de PNM en CLUP-QTOF (a) en POS et spectre de fragmentation MS^E (b)

D'après la Figure 45, 4 ions prédominants ont été mis en évidence. On observe des différences de 42 unités entre l'ion m/z 379,046 et l'ion m/z 337,036 ainsi qu'entre l'ion de m/z 437,052 et celui de m/z 395,041. Cette différence ne correspond pas à un adduit acétonitrile puisque dans ce cas, on aurait une différence de 41. Des hypothèses de formule ont été élaborées grâce au logiciel de spectrométrie de masse : $C_{18}H_9O_7$ pour l'ion de m/z 337,0348 et $C_{20}H_{11}O_8$ pour l'ion de m/z 379,0454. Ces deux formules mettent en évidence une différence due à un groupement C_2H_2O . Concernant les autres ions, aucune formule probable n'a été observée. L'analyse en mode négatif d'ionisation révèle aussi la présence de l'ion m/z 437,0498 majoritaire sous un profil isotopique très particulier, similaire à celui obtenu en mode positif d'ionisation. L'interprétation est relativement difficile pour ce spectre de masse.

Cependant, une autre hypothèse peut être constituée en analysant les ions fragments. Ils ne sont pas directement issus de la fragmentation de l'ion parent majoritaire en *full scan*. La technique MS^E casse tous les ions présents avec une énergie croissante. La présence de l'ion de m/z 354,037, bien que non majoritaire sur le *full scan*, mais présence d'ions fragments communs (entre a et b), pourrait correspondre à l'ion $[M+H]^+$, déjà identifié en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona (Figure 41). Il pourrait s'agir d'une molécule azotée de MM 353 g/mol. L'ion de m/z 337 peut correspondre à la perte de NH_3 . L'ion de m/z 379,046 $[M-NH_3+42]^+$ et l'ion de m/z 437,052 $[M+H+83]^+$ sembleraient correspondre à des adduits acétonitrile. L'ion-fragment de m/z 309,040 présent en MS^E pourrait correspondre à $[M-NH_3-CO+H]^+$, préalablement observé (Figure 41). L'analyse en

ionisation négative n'a pas permis de retrouver l'ion correspondant à $[M-H]^-$, probablement dû au fait que la molécule ne s'ionise pas bien en mode négatif.

Fractionnement de l'extrait PNM

Au vu de l'activité biologique de l'extrait PNM, de son profil chromatographique relativement simple, et de la quantité importante extraite, un fractionnement a été réalisé afin d'étudier la composition de cet extrait et éventuellement relier l'activité à un composé. Celui-ci a permis de séparer l'extrait brut en 18 fractions de polarité croissante, regroupées par profil CCM identique. Le nom des fractions, leur mélange de solvant dans lequel les fractions ont été éluées sur la colonne et le rendement par rapport à la quantité déposée d'extrait brut de PNM, soit 1 g, sont présentés dans le Tableau 20. Le fractionnement a d'abord été réalisé sur 1 g d'extrait afin d'observer si la méthode de fractionnement était correcte. L'ensemble de l'extrait nécessitera un fractionnement par la suite.

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des fractions obtenues à partir de PNM

Noms des fractions	Solvant d'élution (CHCl ₃ /MeOH)	Rendement en mg par rapport à l'extrait sec déposé 1g (%)
F1	99/1	2 (0,2%)
F2-3	99/1	2 (0,2%)
F4-6	99/1	3,5 (0,4%)
F7-13	99/1	8,4 (0,8%)
F14-15	97/3	19,7 (2,0%)
F16-19	95/5	3,7 (0,4%)
F20-23	90/10	9,7 (1,0%)
F24-25	90/10	2,8 (0,3%)
F26-27	85/15	3,5 (0,35%)
F28-29	85/15	25,4 (2,5%)
F30	80/20	5 (0,5%)
F31-38	80/20	23,2 (2,3%)
F39-41	70/30	13,3 (1,3%)
F42-55	70/30	134,3 (13,4%)
F56-61	50/50	205,4 (20,5%)
F62-66	30/70	221,1 (22,1%)
F67-68	10/90	38 (3,8%)
F69	0/100	57,2 (5,7%)
Total		778,2 (77,8%)

Ces fractions sont alors analysées en CCM (Figure 46) puis en CLHP-SM/SM-Corona afin de déterminer les ions majoritaires de chaque fraction. La multitude de données acquises

a amené à se focaliser principalement sur les pics majoritaires retrouvés en CLHP-DAD. Le détecteur universel corona nous permet de quantifier la présence des composés.

Sur la Figure 46 à gauche, une tache bleue (R_f 0,61) a été retrouvée dans la fraction F16-19, visible seulement dans cette fraction. Cette fraction a alors été analysée en infusion directe sur le LCQ en ESI positif, seuls les contaminants présents (Figure 31) ont été retrouvés avec des ions de m/z 304,26 (pic **3**), m/z 332,28 (pic **4**), m/z 360,29 (pic **5**) et m/z 388,39 (pic **6**). Aucun ion majoritaire n'a été identifié. Il est possible que les composés présents dans cette fraction ne s'ionisent pas bien avec l'électrospray. La fraction F28-29 (Figure 46 gauche) présente un profil chromatographique relativement simple et apparaît en quantité suffisante (Tableau 20) pour continuer son analyse chimique.

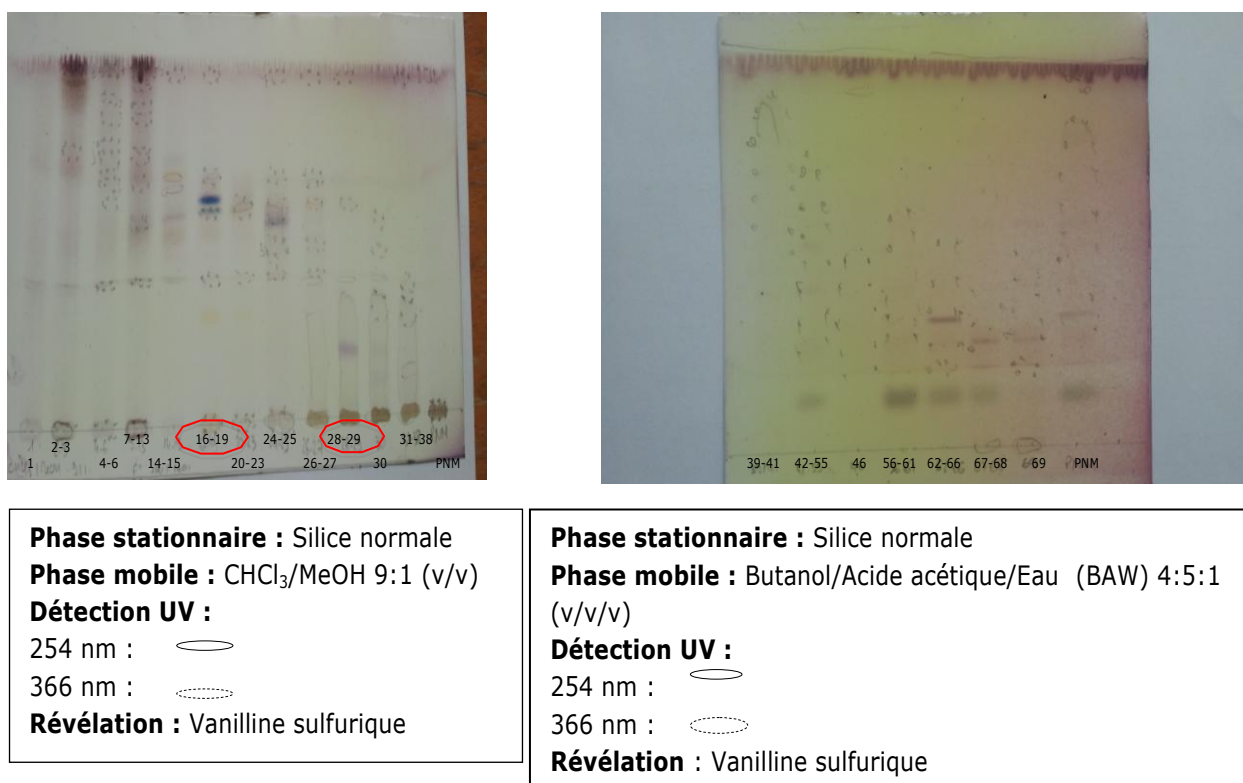


Figure 46 : CCM récapitulative des fractions réunies de l'extrait PNM de 1 à 38 (à gauche) et de 39 à 69 (à droite)

Etude chimique de la fraction 28-29 de l'extrait PNM

Toutes les fractions ont été analysées en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. La fraction F28-29 a montré un profil chromatographique relativement simple avec un pic majoritaire donné par la barrette de diode (a Figure 47). Le spectre UV du pic à 7,5 min présente quatre maxima d'absorption : $\lambda_{\text{max}} = 243, 278, 331$ et 344 nm (e Figure 47). Ce spectre UV présente les même λ_{max} que lors de l'analyse de l'extrait brut PNM en CLUHP-BD à

22,7 min (e Figure 37 : $\lambda_{\max} = 224_{\text{sh}}, 246, 278, 330, 344 \text{ nm}$). Ces deux spectres UV similaires démontrent que ces deux produits appartiennent au même groupe chimique de molécules. Sur le chromatogramme (b), le corona indique la présence de quantité sous le pic correspondant à celui détecté sur le PDA. Néanmoins, d'autres pics sont aussi détectés mais ne seront pas analysés ici puisqu'ils n'absorbent pas en UV (a et c Figure 47). En mode d'ionisation positive (d Figure 47), un pic majoritaire à un temps de rétention de 7,76 min pouvant correspondre au pic 7,5 min sur le PDA en raison du montage en série des détecteurs. D'autres pics présents aussi sur ce chromatogramme (d) indique que la fraction n'est pas pure et ne seront pas traités ici.

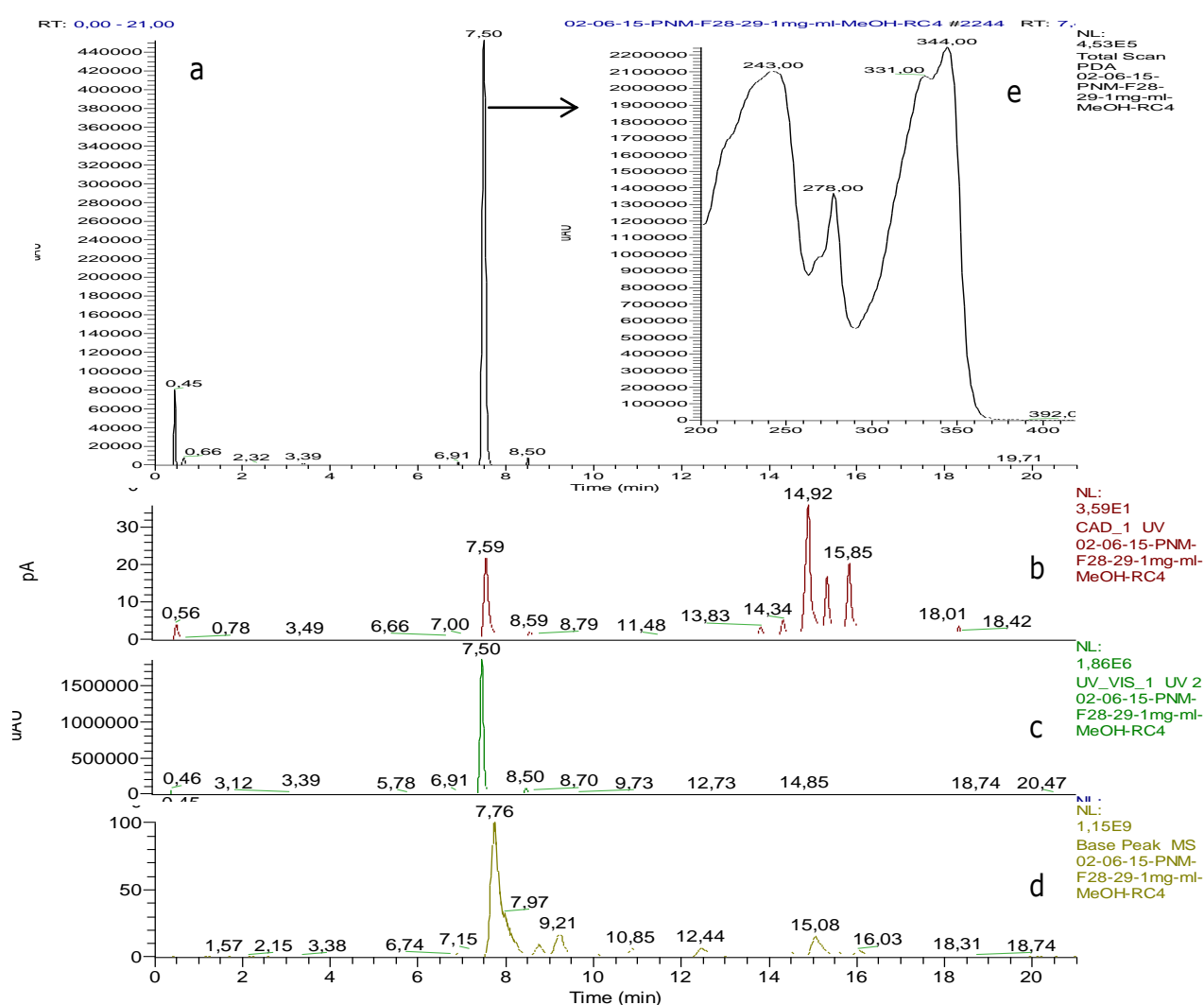


Figure 47 : Chromatogrammes de la fraction 28-29 de l'extract méthanolique de *P. niger* obtenus par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d) et le spectre UV du pic à 7,50 min (e)

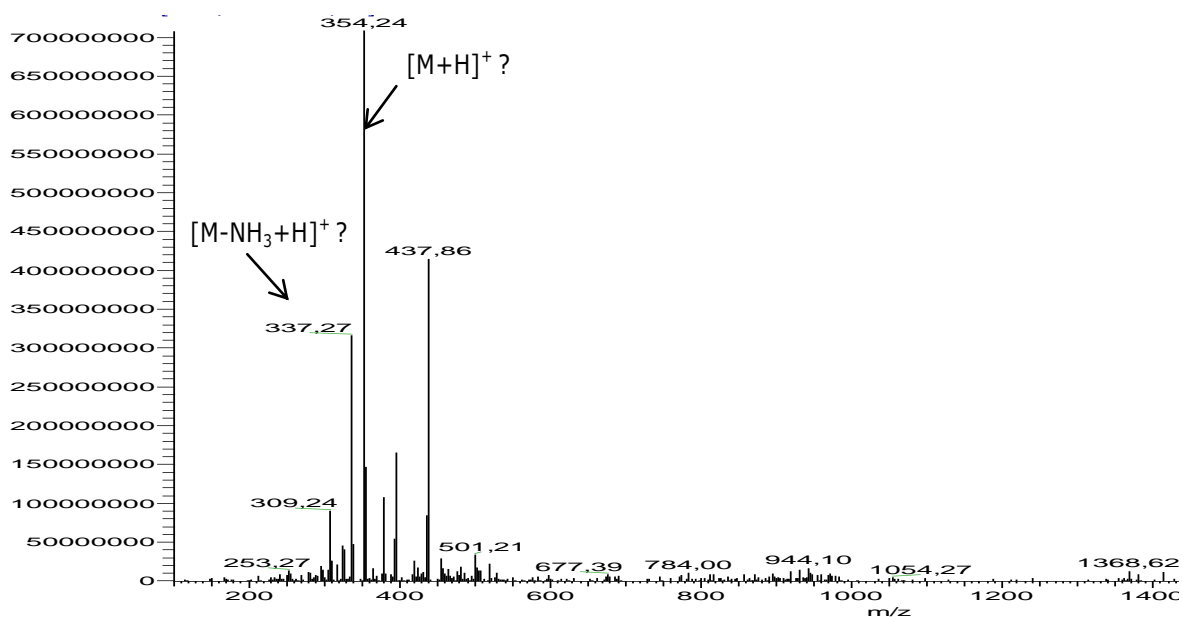


Figure 48 : Spectre de masse en *full scan* du pic (TR : 7,76 min) de la fraction 28-29 de PNM, en mode positif d'ionisation

La Figure 48 révèle pour le pic (TR : 7,76 min) un ion majoritaire de m/z 354,24 pouvant correspondre à l'adduit proton $[M+H]^+$ d'une molécule de MM 353 g/mol comme décrit précédemment lors de l'analyse du pic **2** (TR : 7,72 min) (a Figure 41) de l'extrait brut de *Phellodon niger*. Un ion de m/z 337,12 identifié en *full scan* pourrait correspondre à la forme ionique $[M-NH_3+H]^+$. Le mode *data dependent scan* n'a pas permis de retrouver les mêmes ions fragments que décrit précédemment pour l'extrait (b Figure 41) et n'est donc pas présenté ici. Afin de confirmer l'hypothèse que cet ion de m/z 354,24 présents dans la fraction 28-29 soit le même que celui identifié dans l'extrait brut, la fraction est ainsi analysée en CLUP®-ESI-QTOF-SM^E dont le chromatogramme (Figure 49) et les spectres (Figure 50 et Figure 52) sont présentés ci-dessous.

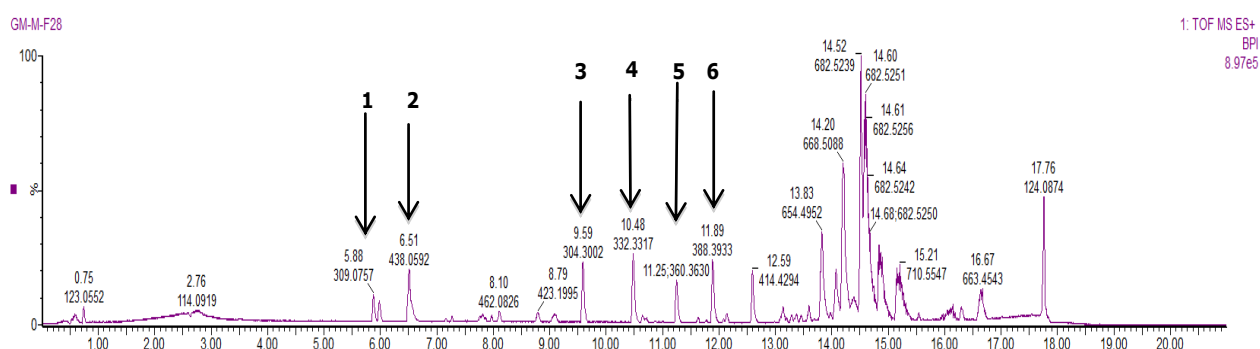


Figure 49 : Chromatogramme de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM^E

Sur la Figure 49, les quatre ions identifiés comme contaminants, sels de benzylalkyl-méthylammonium sont toujours présents **3, 4, 5, 6** [71]. Cependant, on note aussi la

présence de deux pics, **1** et **2** dont les spectres de masse sont présentés (Figure 50) et (Figure 52).

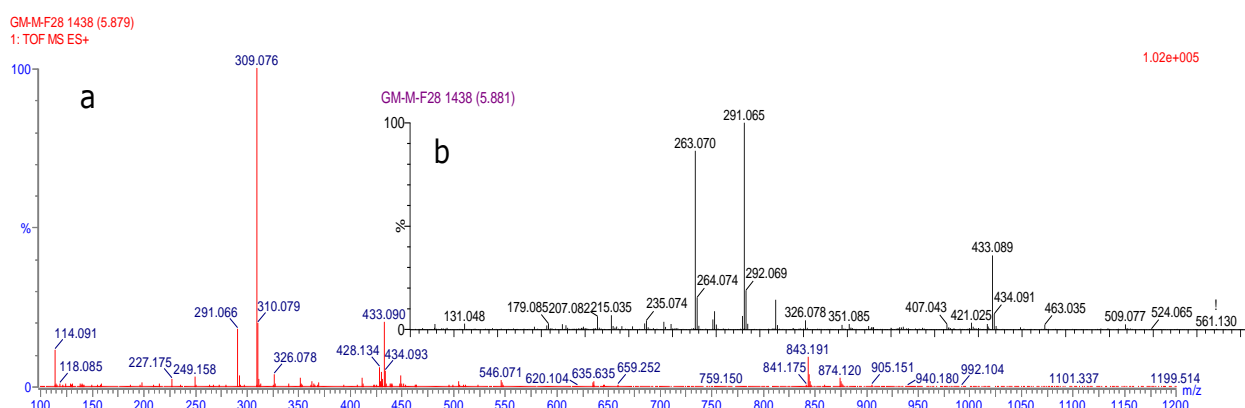


Figure 50 : Spectre de masse du pic **1** (TR : 5,88 min) de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM^E en positif (a) et spectre de fragmentation SM^E (b)

Sur la Figure 50, pour le pic **1**, on note la présence d'un ion majoritaire de m/z 309,076, correspondant probablement à $[M+H]^+$. Les ions-fragments de m/z 291,065 et de m/z 263,070, présents sur le spectre (b), pourraient correspondre respectivement à une perte d'eau $[M+H-18]^+$, et à la perte de $[M+H-18-28]^+$ pouvant correspondre à $[CO+H_2O]$ caractéristique d'une fonction acide carboxylique. Le logiciel MassLynx propose, pour m/z $[M+H]^+$ 309,076, une formule brute probable $C_{18}H_{13}O_5^+$. De nombreux acides identifiés chez les macromycètes sont retrouvés chez les Boletales [75], notamment l'acide pulvinique correspondant à la formule brute $C_{18}H_{12}O_5$ (**40** Figure 51). L'isolement de la molécule et la réalisation d'expérience en R permettraient de déterminer la structure avec certitude.

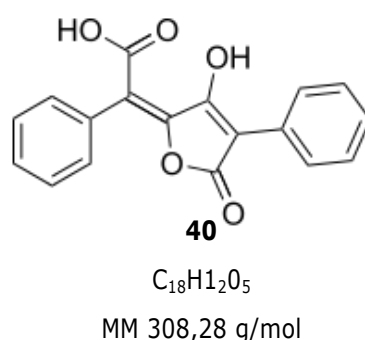


Figure 51 : Structure chimique de l'acide pulvinique (**40**)

Le spectre en ionisation négative n'a pas permis de retrouver l'ion correspondant à $[M-H]^-$ ou encore à un adduit acide formique $[M-HCOOH-H]^-$. Dans le cas de l'hypothèse d'une molécule acide, cela semble relativement inattendu.

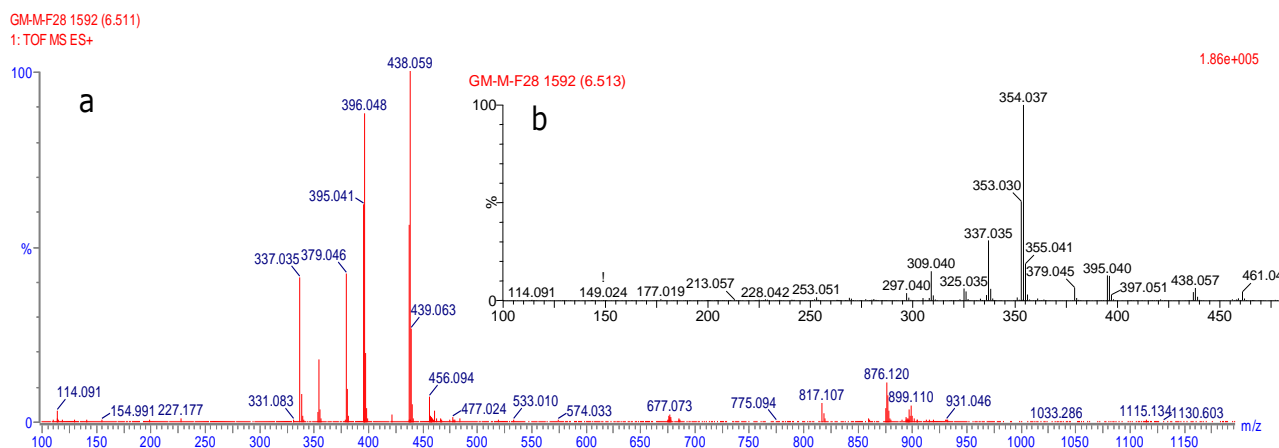


Figure 52 : Spectre de masse du pic **2** (TR : 6,51 min) de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM^E en positif et spectre de fragmentation SM^E (b)

D'après la Figure 52, 4 ions prédominants ont été mis en évidence (a). On observe des différences de 42 unités entre l'ion m/z 379,046 et l'ion m/z 337,036 ainsi qu'entre l'ion de m/z 437,052 et celui de m/z 395,041. Ce spectre de masse a déjà été analysé Figure 41 pour le pic **2** de l'extrait PNM.

La présence de l'ion m/z 354,037 en MS^E (b), bien que non majoritaire sur le *full scan*, pourrait correspondre au $[M+H]^+$, déjà identifié lors de l'analyse de l'extrait PNM en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona (Figure 41) et en CLUP-QTOF (Figure 45) en mode positif d'ionisation. Il pourrait s'agir hypothétiquement d'une molécule azotée de MM 353 g/mol. L'ion m/z 337 peut correspondre à la perte de NH_3 . L'ion m/z 379,046 $[M-NH_3+42]^+$ et l'ion m/z 437,052 $[M+H+83]^+$ sembleraient correspondre à des adduits acétonitrile. L'ion-fragment m/z 309,040 présent en MS^E pourrait correspondre à $[M+H-NH_3-CO]^+$, préalablement identifié sur la Figure 41. L'analyse en ionisation négative n'a pas permis de retrouver l'ion correspondant à $[M-H]^-$, probablement dû au fait que la molécule ne s'ionise pas bien en mode négatif.

Conclusion sur l'analyse de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger*

Analyse de l'extrait brut PNM

L'extrait méthanolique de *Phellodon niger* a révélé quant à lui un chromatogramme plus simple que le précédent extrait en CLUHP-BD avec un pic majoritaire et d'un pic très large sur le chromatogramme à 254 nm (chromatogramme rose Figure 36) avec le gradient 1.

D'après les données de la littérature, le composé supposé de MM 352 g/mol pourrait correspondre à l'acide théléphorique (**38**) composé déjà isolé de l'espèce *Phellodon niger*

[71]. En revanche, la molécule ayant une masse supposée de 353 g/mol n'a pas été identifiée dans la littérature dans le règne des Fungi. Une analyse en spectrométrie de masse haute résolution nous a permis de supposer une formule brute probable.

En CLUP®-ESI-QToF-SM^E, deux pics ont particulièrement été étudiés (**1** et **2** Figure 43). Le pic **1** à 5,33 min laisse supposer une molécule de masse 368 g/mol. Cette molécule aurait pour formule brute probable C₁₈H₈O₉ qui n'a pas été retrouvée dans la littérature des produits naturels isolés.

La présence du pic **2** (TR : 6,51 min) laisse supposée une masse moléculaire de 353 g/mol. Cette masse était aussi retrouvée en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona et était identifiée comme une molécule azotée non identifiée dans la littérature dans le règne des Fungi.

Analyse chimique de la fraction 28-29 de l'extrait PNM

Le Tableau 22 résume les ions obtenus en CLUP®-ESI-QToF-SM^E pour l'analyse de cette fraction.

La présence de l'ion de m/z 309,05 en mode positif d'ionisation (pic **1** Figure 50) est détectée dans cette fraction. Cet ion a été préalablement évoqué comme ion-fragment d'un ion de m/z 354,21, identifié comme le pic **2** lors de l'analyse de l'extrait brut PNM (Figure 45). Cette molécule pourrait correspondre à l'acide pulvinique (Figure 51), déjà identifié chez les Boletales [75].

Les composés détectés dans l'espèce *Phellodon niger* proviendraient de la même voie de biosynthèse. La biogénèse des composés terphényles provient de la voie de l'acide shikimique, transformé en acide chorismique puis en acide arylpyruvique [71]. Les terphényles quinones, résultant de la condensation de deux molécules, sont des composés produits par les basidiomycètes, dont appartient l'espèce *Phellodon niger*. Lors de cette biosynthèse, un grand nombre de dérivés d'acides pyruviques interviennent. L'atromentine, terphényle quinone (MM 324 g/mol C₁₈H₁₂O₆), est l'intermédiaire pour de nombreuses conversions pour des composés plus hydroxylés et pour les acides pulviniques. Ces petits acides, théléphoriques et pulviniques, retrouvés dans les macromycètes dont les boletales [75], sont identifiés comme étant des pigments. Dans ces deux publications [71] et [75], les terphényles ont présentés des activités biologiques : antioxydante, piègeurs de radicaux libres et antibactérienne.

L'ion de m/z 354,037 en mode positif d'ionisation (pic **2** Figure 52) est détecté dans cette fraction. Cet ion, préalablement identifié comme pouvant correspondre à une molécule de masse moléculaire 353 g/mol, laisse supposée une molécule azotée.

Cette fraction a subi une analyse RMN mais était difficilement analysable en raison d'une fraction non pure. Un nouveau fractionnement serait nécessaire afin d'obtenir un seul pic sur le chromatogramme, qui pourrait alors être plus facilement analysable en RMN afin d'obtenir la structure de la molécule.

Les deux méthodes utilisées, trappe d'ions (TI) et QTOF sont deux analyseurs différents. Le mode *data dependent scan* est possible seulement avec la TI. Il est plus facile de corréler les ions fragments aux ions parents. Cette technique, utilisant la trappe d'ion, nous permet de faire du *data dependent scan* ce qui facilite l'analyse pour corréler les fragments. Cependant, la précision est plus importante avec un *Quadrupole Time Of Flight* (QTOF) ; technique de haute résolution nous permettant d'obtenir la formule brute.

La source d'ionisation, électrospray, est la même pour les deux techniques. Cependant, les gradients utilisés ont été légèrement différents (HCOOH présent dans l'eau et dans l'ACN pour la haute résolution). Ceci pourrait expliquer les différences d'ionisation

Tableau 21 : Récapitulatif des analyses de spectrométrie de masse sur les extraits méthanoliques des deux espèces étudiées

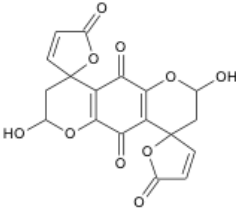
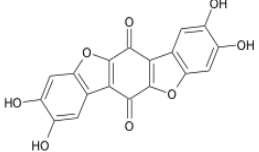
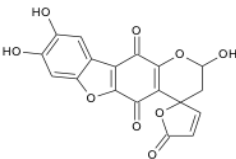
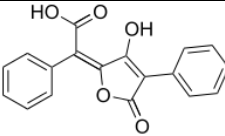
	Pic	<i>Hydnellum ferrugineum</i>						<i>Phellodon niger</i>					
		TR	Positif (m/z)	Négatif (m/z)	MM supposée (g/mol)	Molécule supposée	Structure chimique supposée	TR	Positif (m/z)	Négatif (m/z)	MM supposée (g/mol)	Molécule supposée	Structure chimique supposée
CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona	1	6,3	370,94 388,94	-	388	Hydnuferruginine		7,1	353,11	351,14	352	Acide théléphorique $C_{18}H_8O_8$	
	2	7,4	371,06	415,01 [M+HCO OH-H] ⁻	370	Hydnuferrugine		7,7	354,21	352,20	353	Azotée ?	?
CLUP®-ESI-QTof-SM ^E	1	Réalisé mais présence de contaminants nylon => Non interprétable						5,33	369	367,008	368	$C_{18}H_8O_9$?
	2							6,51	354,037	-	353	Azotée ?	?

Tableau 22 : Récapitulatif des analyses chimiques sur la fraction 28-29 de l'extrait *Phellodon niger* méthanolique (PNM)

<i>Phellodon niger</i>	Pic	TR	Fraction 28-29				
			Positif	Négatif	MM supposée (g/mol)	Molécule supposée	Structure chimique supposée
CLUP®-ESI-QTof-SM ^E	1	5,88	309,076	-	309	$C_{18}H_{12}O_5$	
	2	6,51	354,037	-	353	Azotée ?	?

Conclusion

La strongylose à *Haemonchus contortus* est une parasitose présente chez les ovins sur tous les continents. En France métropolitaine, l'haemonchose n'est pas la plus fréquente des strongyloses. Cependant, des conditions climatiques chaudes et humides sont favorables à l'apparition brutale et imprévisible de ce parasite, notamment de juin à septembre [76]. Ce parasite hématophage provoque des ravages dans les élevages des moutons avec en symptôme principal une anémie pouvant conduire à la mort de l'animal parasité ou encore une altération de la laine et une baisse de reproduction. Différents moyens de lutte contre ce strongle gastro-intestinal chez les ovins peuvent être utilisés. Les anté-endectocides, tels que les benzimidazoles et pro-benzimidazoles, sont les deux familles les plus utilisées dans les élevages laitiers dans le monde [19] car ils disposent de délais d'attente nuls pendant la lactation. D'autres anté-endectocides tels que les imidazo-thiazoles, tétrahydropyrimidines et les phénols halogénés sont aussi utilisés. Enfin, les endectocides tels que les lactones macrocycliques sont largement utilisés car ils possèdent un spectre d'action large et une activité rémanente. Cependant, l'apparition de résistances dans les années 1960 devient une préoccupation majeure dans l'économie de la pharmacie vétérinaire. Il s'agit d'une diminution de la réponse au traitement chez une population sensible. Ceci est dû à une préadaptation par mutation dont la transmission est héréditaire. L'utilisation de ces anthelminthiques exerce une pression de sélection permettant aux parasites naturellement résistants de survivre et de se reproduire.

Le grand public se préoccupe de plus en plus de l'utilisation de substances chimiques en agriculture et de la présence de résidus médicamenteux dans les biens de consommation [22]. L'Union Européenne encourage donc les projets visant à la recherche de solutions alternatives à l'utilisation d'anthelminthiques. C'est dans ce contexte qu'a été réalisé le travail expérimental présenté dans cette thèse : une étude chimique et biologique (activité antiparasitaire sur *Haemonchus contortus*) de deux champignons oubliés, présents en grande quantité dans la région Midi-Pyrénées, *Hydnellum ferrugineum* et *Phellodon niger*.

A partir de ces deux champignons, des extraits de polarités différentes ont été réalisés. L'activité biologique de chaque extrait brut a alors été étudiée sur deux tests différents : test d'éclosion des œufs et test de dégagement des larves sur une souche sensible

d'*Haemonchus contortus* et sur une souche résistante aux traitements anthelminthiques de type benzimidazoles et aux avermectines. Les extraits aqueux et méthanoliques se sont révélés avoir la meilleure activité inhibitrice sur l'éclosion des œufs et sur le dégainement des larves aux différentes concentrations testées. Ces deux types d'extraits ont été analysés pour étudier leur composition chimique. Les extraits aqueux étant difficiles à étudier, nos efforts se sont focalisés sur les extraits méthanoliques. Celui d'*Hydnellum ferrugineum* (HFM) a présenté un profil chromatographique relativement complexe. En spectrométrie de masse, deux composés ont été proposés pour HFM : hydnuferugine et hydnuferuginine, molécules préalablement isolées chez *Hydnellum ferrugineum* par Gripenberg en 1974 puis en 1981 [62]. Pour l'extrait brut méthanolique de *Phellodon niger*, une molécule de masse moléculaire 308 g/mol a été identifiée pouvant correspondre à l'acide pulvinique. Au vu des résultats d'activité biologique, du profil chromatographique et de la quantité de l'extrait brut PNM, un fractionnement a été réalisé sur ce dernier extrait. Dix huit fractions ont été obtenues sur la base des profils chromatographiques des sous-fractions. La fraction F28-29 a été plus particulièrement étudiée. Un composé pourrait correspondre à l'acide théléphorique, composé isolé d'un certain nombre de champignons dont notamment *Hydnellum ferugineum* et *Phellodon niger*, répertoriés dans la revue de Liu [71].

Afin de déterminer où se concentre l'activité, il faudrait réaliser à nouveau les deux tests biologiques sur les différentes fractions obtenues. Ensuite, un fractionnement sur la quantité totale d'extrait pourra être envisagé dans le but d'obtenir une quantité plus importante permettant de fractionner à nouveau l'extrait actif dans le but d'isoler la (ou les) molécule(s) responsable(s) de l'activité observée. Des analyses structurales plus approfondies, comme la RMN, permettront de déterminer la structure de ce(s) composé(s).

L'objet de cette étude était de trouver des solutions alternatives aux traitements anthelminthiques de synthèse. Des résultats intéressants ont été retrouvés sur les deux tests réalisés, inhibition de dégainement des larves et inhibition de l'éclosion des œufs en larves. Les extraits polaires ont montré des résultats particulièrement intéressants notamment l'extrait aqueux de *Phellodon niger*, avec une activité inhibitrice 50 fois moins active que l'anthelminthique thiabendazole, utilisé comme témoin positif. Cet extrait s'est

révélé difficilement analysable du point de vue de sa composition. Des analyses complémentaires pour la séparation des composés présents dans l'extrait pourraient être élaborées. L'extrait méthanolique de *Phellodon niger* a aussi présenté des résultats intéressants et a été fractionné dans cette étude. Cependant, des tests biologiques sont indispensables afin de savoir quel est le composé responsable de l'activité. Un fractionnement bio-guidé est alors nécessaire.

Bibliographie

- [1] R. M. Kaplan, "Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report.", *Trends in parasitology*, vol. 20, no. 10, pp. 477–481, 2004.
- [2] S. M. Thamsborg, "CARES - Coping with Anthelmintic RESistance in ruminants." [Online]. Available: <http://www.eucares.org/wb/pages/research.php>. [Accessed: 28-Apr-2015].
- [3] M. F. Qamar, A. Maqbool, M. S. Khan, and al., "Epidemiology of Haemonchosis in sheep and Goats under different managerial conditions", *Veterinary world*, vol. 2, no. 11, pp. 413–417, 2009.
- [4] E. Barrau, N. Fabre, I. Fouraste, and al., "Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus* : role of tannins and flavonol glycosides", *Parasitology*, vol. 131, no. 04, pp. 531–538, 2005.
- [5] N. Kalogeropoulos, A. E. Yanni, G. Koutrotsios, and al., "Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece.", *Food and chemical toxicology*, vol. 55, pp. 378–385, 2013.
- [6] M. J. Alves, I. C. F. R. Ferreira, A. Martins, and al., "Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics.", *Journal of applied microbiology*, vol. 113, no. 2, pp. 466–475, 2012.
- [7] L. Smolskaitė, P. R. Venskutonis, and T. Talou, "Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species", *LWT - Food Science and Technology*, vol. 60, no. 1, pp. 462–471, 2015.
- [8] M. C. Durette-Desset and A. G. Chabaud, "Nomenclature of Strongylidae above the family group", *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, vol. 68, no. 2, pp. 111–112, 1993.
- [9] Biotechnology and Biological Sciences Research Council, "Parasitic Worms." [Online]. Available: <https://bugconsortium.wordpress.com/parasitic-worms/>. [Accessed: 18-May-2015].
- [10] C. Lacroux, "Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) dans deux races ovines", Thèse doctorale, Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, Ecole Vétérinaire de Toulouse - ENVT, n°2346, 2006.
- [11] C. Dudouet, *La production du mouton*, 3ème ed. Editions France Agricole, 2012, p. 330.
- [12] P.-C. Lefèvre, J. Blancou, and R. Chermette, "Helminthoses digestives", in "*Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail*", Editions TEC & DOC and Editions Médicales Internationales, Eds. 2003, p. 1761.
- [13] Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, "Coproscopie Parasitaire." [Online]. Available: http://www2.vetagro-sup.fr/etu/copro/sommaire/techniques/analyse/coprocult_ad_ov_suite.htm. [Accessed: 20-Sep-2015].

- [14] C. Chartier, A. Lespine, H. Hoste, and al., "Les endectocides chez les caprins : pharmacologie, efficacité et conditions d'utilisation dans le contexte de la résistance aux anthelminthiques", *Rencontre Recherche Ruminant*, vol. 8, no. 1, pp. 181–186, 2001.
- [15] W. E. SWALES, "Tests of phenothiazine, a highly efficient anthelmintic", *Canadian Journal of Comparative Medicine*, vol. III, no. 7, pp. 189 – 194, 1936.
- [16] J. H. Drudge, S. J. Lelan, and Z. Wyant, "Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. II. studies on pure infections of *Haemonchus contortus*", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 67, no. 25, p. 317, 1957.
- [17] Werkgroep Wormmiddelen, "Phenothiazine", in "*Drugs anthelmintics*", 1973, pp. 810–813.
- [18] S. Pautric-Thomas, "Données récentes sur la résistance aux anthelminthiques des strongles gastro-intestinaux des ruminants", Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2003.
- [19] E. Lacey, "Mode of Action of Benzimidazoles", *Parasitology Today*, vol. 6, no. 4, pp. 112–115, 1990.
- [20] G. W. Lubega and R. K. Prichard, "Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*", *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 38, pp. 221–232, 1990.
- [21] F. Manolaraki, "Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués", Thèse de doctorat, Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2011.
- [22] Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique, "Médicaments antiparasitaires", in "*Répertoire commenté des médicaments à usage vétérinaire*", Pr P. Gustin, Ed. Gent, 2012, p. 336.
- [23] M. Labadie, "Interactions médicamenteuses en médecine vétérinaire : exemple des benzimidazoles", Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, N°4004, 2005.
- [24] C. G. Gebelein, C. E. Carraher, and V. R. Foster, "Effect of tetramisole and its platinum polyamine on mice infected with Encephalomyocarditis-Variant-D virus", in "*Applied bioactive polymeric materials*", Springer S., 1988, p. 330.
- [25] A. Chretien, "Cinétique comparée des phénomènes physiopathologiques et de la réponse immune chez des ovins résistants ou sensibles au cours d'une primo-infestation par *Hameonchus contortus*", Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, n°4060, 2011.
- [26] P. Guerre and Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, "Chimie et métabolisme : antiparasitaires." [Online]. Available: <http://pharmtox.free.fr/default.htm>. [Accessed: 24-Oct-2015].
- [27] "Les mitochondries et la respiration." [Online]. Available: <http://www.afblum.be/bioafb/-mitochon/mitochon.htm>. [Accessed: 24-Oct-2015].

- [28] F. Veillet, "Le closantel : synthèse bibliographique", Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, n°4001, 2001.
- [29] S. Powalla, "Guide d'usage des anthelminthiques chez les carnivores domestiques", Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, n°110, 2008.
- [30] T. Bengone-Ndong and M. Alvinerie, "Macrolides antiparasitaires : propriétés pharmacologiques générales et recommandations d'usage dans le contexte vétérinaire africain", *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, vol. 57, no. 1–2, pp. 49–58, 2004.
- [31] S. Omura, "Ivermectin: 25 years and still going strong.", *International journal of antimicrobial agents*, vol. 31, pp. 91–98, 2008.
- [32] R. Garg, R. Kumar, C. Yadav, and al., "Duration of anthelmintic effect of three formulations of ivermectin (oral, injectable and pour-on) against multiple anthelmintic-resistant *haemonchus contortus* in sheep", *Veterinary research communications*, vol. 31, no. 6, pp. 749–755, 2007.
- [33] ANSES, "Index des médicaments." [Online]. Available: <http://www.ircp.anmv.anses.fr/-results.aspx>. [Accessed: 08-Nov-2015].
- [34] C. Drogoul and H. Germain, *Santé animale : bovins, ovins, caprins*. Editions Educagri, 1998, p. 346.
- [35] C. Mage, *Parasites des Moutons : Prévention, Diagnostic, Traitement*, 2ème ed. Editions France Agricole, 2008.
- [36] G. C. Coles, "Drug resistance and drug tolerance in parasites", *Trends in parasitology*, vol. 22, no. 8, p. 348, 2006.
- [37] A. Boulkaboul and A. B. D. Kerboeuf, "Détection d'une résistance aux benzimidazoles chez les strongles digestifs du cheval en Algérie", *Revue de médecine vétérinaire*, vol. 17, no. 2, pp. 59–64, 2006.
- [38] J. Cabaret, "Anthelmintic resistance in goats : from fiction to facts.", in *Proceeding of the 7th international conference on goats*, pp. 793–794, 2000.
- [39] N. C. Sangster, "Managing parasiticide resistance", *Veterinary Parasitology*, vol. 98, no. 2001, pp. 89–109, 2006.
- [40] J. H. Drudge, J. Szanto, Z. N. Wyatt, and al., "Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine", *American journal of veterinary research*, vol. 25, pp. 1512–1518, 1964.
- [41] N. C. Sangster, H. V. Whitlock, I. G. Russ, and al., "*Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole – occurrence of field strains", *Research in Veterinary Science*, vol. 27, no. 1, pp. 106–110, 1979.
- [42] R. K. Prichard, C. A. Hall, J. D. Kelly, and al., "The problem of anthelmintic resistance in nematodes", *Australian Veterinary Journal*, vol. 56, no. 5, pp. 239–250, 1980.
- [43] M. R. Chapman, "Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population 1", *Veterinary Parasitology*, vol. 66, no. 96, pp. 205–212, 1996.

- [44] J. A. Van Wyk and F. S. Malan, "Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa.", *The Veterinary Record*, vol. 123, pp. 226–228, 1988.
- [45] J. H. Boersema, M. Eysker, and J. W. M. Nas, "Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones", *The veterinary record*, vol. 150, no. 9, pp. 279–281, 2002.
- [46] T. G. Watson, B. C. Hosking, D. M. Leathwick, and al., "Ivermectin-moxidectin side resistance by *Ostertagia* species isolated from goats and passaged to sheep", *The veterinary record*, vol. 138, no. 19, pp. 472–473, 1996.
- [47] H. A. Shalaby, "Anthelmintics Resistance; How to Overcome it?", *Iranian journal of parasitology*, vol. 8, no. 1, pp. 18–32, 2013.
- [48] N. C. Sangster and J. Gill, "Pharmacology of Anthelmintic Resistance", *Parasitology today*, vol. 15, no. 4, pp. 141–146, 1999.
- [49] C. Chartier and H. Hoste, "Perspectives de lutte contre les strongyloses gastro-intestinales des ruminants domestiques", *Le point vétérinaire*, vol. 28, pp. 1907–1914, 1997.
- [50] G. Eyssartier and P. Roux, *Le guide des champignons*, Belin. 2013, p. 1119.
- [51] Muséum National d'Histoire Naturelle, "Inventaire National du Patrimoine Naturel", 2003. [Online]. Available: http://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/37666.
- [52] M. Stadler, T. Anke, J. Dasenbrock, and al., "Phellodonic acid, a new biologically active hirsutane derivative from *Phellodon melaleucus* (Thelephoraceae, Basidiomycetes)", *Zeitschrift für naturforschung*, vol. 48c, pp. 545–549, 1993.
- [53] C. Tringali, M. Piattelli, C. Geraci, and al., "Previously unreported p-terphenyl derivatives with antibiotic properties from the fruiting bodies of *Sarcodon leucopus* (Basidiomycetes). A two-dimensional nuclear magnetic resonance study", *Canadian journal of chemistry*, vol. 7, pp. 8–11, 1987.
- [54] D. Luo, H. Shao, H. Zhu, and al., "Activity *in vitro* and *in vivo* against Plant Pathogenic Fungi of Grifolin Isolated from the Basidiomycete *Albatrellus dispansus*", *Zeitschrift für naturforschung*, vol. 60c, pp. 50–56, 2005.
- [55] N. Ishii, A. Takahashi, G. Kusano, and al., "Studies on the constituents of *Polyporus dispansus* and *P. confluens*", *Chemical and pharmaceutical bulletin*, vol. 36, pp. 2918–2924, 1988.
- [56] S. F. Fang, L. Z. Hang, L. I. Zheng-hui, and al., "Cyathane Diterpenoids and Nitrogenous Terphenyl Derivative from the Fruiting Bodies of Basidiomycete *Phellodon niger*", *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 58, no. 9, pp. 1176–1179, 2010.
- [57] S.-T. Fang, T. Feng, L. Zhang, and al., "Cyathane diterpenoids from fruiting bodies of *Phellodon niger*", *Natural Products and Bioprospecting*, vol. 1, no. 1, pp. 37–40, 2011.
- [58] H. Shibata, T. Tokunaga, and K. Den, "Isolation and Characterization of New Bitter Diterpenoids from the Fungus *Sarcodon scabrosus*", *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 53, pp. 3373–3375, 1989.

- [59] A. Takahashi, R. Kudo, G. Kusano, and al., "5-Lipoxygenase inhibitors isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas* (Pers.)", *Chemical and pharmaceutical bulletin*, vol. 40, pp. 3194–3196, 1992.
- [60] X. Hu, D. Dou, Y. Pei, and al., "Chemical Constituents of Roots of *Ranunculus ternatus* Thunb.", *Journal of asian natural products research*, vol. 8, no. 1–2, pp. 35–39, 2006.
- [61] J. Gripenberg, "Fungus pigments XXIII + Hydnuferugin: a novel type of a 2,5-diphenylbenzoquinone-derived pigment", *Tetrahedron Letters*, vol. 8, no. 1971, pp. 619–622, 1974.
- [62] J. Gripenberg, "Fungus pigments of *hydnullum ferrugineum*." *Acta Chemica Scandinavica*, pp. 513–519, 1981.
- [63] L. F. Le Jambre, "Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes", *Veterinary parasitology*, vol. 2, pp. 385–391, 1976.
- [64] G. C. Coles, C. Bauer, F. H. M. Borgsteede, and al., "World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance", *Veterinary parasitology*, vol. 44, pp. 35–44, 1992.
- [65] F. Jackson and H. Hoste, "In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes", in "*In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*", Edition Sp., P. E. Vercoe, H. P. S. Makkar, and A. C. Schlink, Edition Springer., p. 247, 2009.
- [66] D. Bahuaud, C. Martinez-Ortiz de Montellano and al., "Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes.", *Parasitology*, vol. 132, pp. 545–554, 2006.
- [67] Dr. Colin Johnstone, "Parasites and parasitic diseases of domestic animals", 1998. [Online]. Available: http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Nematodes/nems_7.htm. [Accessed: 15-Nov-2015].
- [68] S. Brunet, F. Jackson, and H. Hoste, "Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants.", *International journal for parasitology*, vol. 38, pp. 783–790, Jun. 2008.
- [69] R. S. Plumb, K. A. Johnson, P. Rainville, and al., "UPLC / MS^E; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation", *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, vol. 20, pp. 1989–1994, 2006.
- [70] J.-K. Liu, "Natural terphenyls: developments since 1877", *Chemical reviews*, vol. 106, no. 6, pp. 2209–2223, 2006.
- [71] H.-J. Yang, K. H. Park, H. S. Kim, and al., "Characterization of unknown compounds from stainless steel plates in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 21, no. 12, pp. 2000–2004, 2010.
- [72] E. Pretsch and C. Affolter, "Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data". Edition Springer, p. 473, 2000.

- [73] C. Buré, "Fragmentation dans une source à électronébulisation de biomolécules de synthèse : peptides thioester, acétal, aldéhyde et oligonucléotides bromés", Thèse de doctorat, Chimie analytique, Université d'Orléans, 2005.
- [74] J. Velíšek and K. Cejpek, "Pigments of Higher Fungi : A Review", *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 29, no. 2, pp. 87–102, 2011.
- [75] J. Penicaud, "Comparaison de la réponse anticorps systémique des ovins Barbados Black Belly et INRA 401 lors d'infestations expérimentales par *Haemonchus contortus* (Nematoda : Trichostrongylidae)", Thèse d'exercice. Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, n°4025, 2007.

Etat des lieux des traitements anthelminthiques sur *Haemonchus contortus*, strongle gastrointestinal des ovins. Evaluation chimique et biologique sur ce parasite de deux macromycètes : *Phellodon niger* et *Hydnellum ferrugineum*

RÉSUMÉ

Les résistances aux anthelminthiques étant de plus en plus présentes dans les élevages ovins, il est nécessaire de développer des alternatives aux traitements anthelminthiques de synthèse (AHs). Le laboratoire PHARMA-DEV collabore avec l'Ecole Vétérinaire de Toulouse pour développer des molécules d'origine naturelle à visée antiparasitaire. Une présentation d'un parasite gastro-intestinal, *Haemonchus contortus*, permet de détailler ses caractéristiques et les traitements actuels utilisés pour le vaincre. Dans ce but, deux espèces de champignons, *Phellodon niger* et *Hydnellum ferrugineum* ont alors été étudiées d'un point de vue chimique et biologique sur ce parasite. Des extraits ont été réalisés à partir de ces deux espèces et ont été testés sur l'inhibition du dégagement des larves et sur l'inhibition de l'éclosion des œufs en larves. Les extraits polaires ont montré des résultats intéressants. Un fractionnement de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger* a permis de supposer la présence de certains composés, préalablement identifiés dans la littérature. Des études sont à poursuivre par le biais d'un fractionnement bio-guidé dans le but d'identifier et d'isoler la ou les substances responsables de l'activité.

mots-clés : *Haemonchus contortus*, anthelminthiques, résistances, alternatives, *Phellodon niger*, *Hydnellum ferrugineum*, activité biologique, composition chimique

Review of anthelmintic treatments on *Haemonchus contortus*. Chemical and biological evaluation on this parasite of two macromycetes : *Phellodon Niger* and *Hydnellum ferrugineum*

ABSTRACT

Anthelmintic resistances are being more and more present in sheep breedings. Human population is worrying about chemical inputs in their food. It is necessary to develop alternative to synthetic anthelmintic treatments (AHS). The Veterinary School of Toulouse is involved by participating in an European project which tend to search natural product to target parasite. PHARMA-DEV, which is a phytochemistry lab, is part of Midi-Pyrénées region's project interested in enhancing local fungi. A gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus* is presented. The actual synthetic treatments used are detailed. Two species of mushrooms, *Phellodon niger* and *Hydnellum ferrugineum* have been biologically and chemically studied to develop alternative to anthelmintic. Extracts from both species were performed and tested by two assays : Larval Exhealthment Inhibition Assay (LEIA) and Egg Hatch Assay (EHA). Methanolic extracts provides interesting result. The *Phellodon niger's* one were splited and chemically studied. Some molecules were hypothetically identified and first isolated in literature. Studies must be continued through assays and splitting in order to identify and isolate the substances responsible for the activity.

keywords : *Haemonchus contortus*, anthelmintics, resistances, alternatives, *Phellodon niger*, *Hydnellum ferrugineum*, biological activity, chemical composition